

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE BIOLOGIA
Departamento de Genética
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CARDIOVASCULARES (CNIC)**



**ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO Y EPIGENÉTICO
PORMENORIZADO Y SU VALOR
PREDICTIVO PARA SENSIBILIDAD Y RESPUESTA A
QUIMIOTERAPIA CON 5-
FLUOROURACILO/OXALIPLATINO, PARA DEFINIR UN
ALGORITMO MOLECULAR
PRONÓSTICO TRANSFERIBLE A LA CLÍNICA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Rosario Fernández Godino

Bajo la dirección de los doctores
M^a Fe Paz de Paz
Antonio Bernad Miana
Ana Margarita Figueiras Merino

Madrid, 2009

ISBN: 978-84-692-7194-0



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES (CNIC)

Análisis farmacogenético y epigenético pormenorizado y su valor predictivo para sensibilidad y respuesta a quimioterapia con 5-Fluorouracilo/oxaliplatino, para definir un algoritmo molecular pronóstico transferible a la clínica.

Tesis presentada por

Rosario Fernández Godino

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias

Madrid, Marzo 2009

Esta tesis doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M^aFe Paz de Paz y el Dr. Antonio Bernad Miana y bajo la tutela de la Dra. Ana Margarita Figueiras Merino. Inicialmente, el trabajo experimental presentado se realizó en el Laboratorio de I+D del Hospital de Madrid-Montepríncipe. Posteriormente y hasta su finalización, se realizó en el Departamento de Cardiología Regenerativa del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

Dra. M^a Fe Paz de Paz
Directora

Dr. Antonio Bernad Miana
Codirector

Dra. Ana Margarita Figueiras Merino
Tutora

Madrid, Marzo 2009

*“... si es verdad que soy poeta por la gracia de Dios –o del demonio-
también lo es que lo soy por la gracia de la técnica y del esfuerzo...”*

Federico García Lorca

A mis padres

A mis hermanos, Ángel, Víctor y Luli

A Adamo

AGRADECIMIENTOS

¡MUCHAS TUNCIAS!

Han sido tantos los momentos y los amigos que he ido encontrando en el camino que necesitaría un libro entero para dar las gracias.

En primer lugar, gracias mamá, gracias papá, porque cada gota de vuestra frente ha contribuido a colmar el vaso de mi éxito. Gracias por animarme, por enseñarme, por apoyarme, por entenderme aunque este mundo sea tan distinto del vuestro, por intentar hacerme ver las malas rachas como algo necesario y por quererme sin condiciones, en definitiva... gracias por estar ahí siempre. A mis hermanos, Ángel, Víctor y Luli, por su alegría, por ser tan parecidos y a la vez tan distintos de mí, por ser mis modelos, por hacerme saber tantas veces lo orgullosos que os sentís de mí, y porque el sentimiento es recíproco. A mi familia, mis tíos, mis primos, los "agregaos", los que ya se fueron, porque gracias a todos vosotros siento que formo parte de algo grande, porque somos una piña que me da fuerzas para todo lo que me propongo en esta vida y porque sé que siempre estáis dispuestos a lo que haga falta para echarme una mano. Gracias Enzo por tus abrazitos y Pablo, por regalarme tu risa.

Dicen que los amigos pueden contarse con los dedos de una sola mano, pero a mí la suerte me ha sonreído y tengo muchos más de los que merezco. Gracias Lauri, la amiga que siempre tuve, ¿te acuerdas?, por esto y por todo, porque eres grande. Gracias Mar y Vane, desde siempre, para siempre... Las tres habéis contribuido a lo que soy hoy, espero que sigamos compartiendo noches de ron en el futuro y que nos sigamos las vidas de cerca. A Maite, por sus ánimos incondicionales y por los mails de los últimos meses; al fin veo la luz de la que me hablaste. A Alema, Amanda, Raquel, Belén, Ana... por esos años de la facultad que tanto echo de menos y por ser mi apoyo emocional todas esas veces en que sólo un biólogo puede entenderte. Gracias por todo lo que me habéis aguantado en estos años y en adelante, por lo que os queda.

Gracias Lara, pequeño saltamontes, ¿o era al revés? porque contigo puse mi primera PCR y desde entonces no he parado. Gracias por tu paciencia y por todos los croissants a la plancha que acompañamos con risas y, por supuesto, ¡gracias por tu amistad! Nunca olvidaré dónde empezó todo, mis primeros pasos con la bata blanca... Gracias Silvia, Raúl, por... ¡ufff, tantas cosas! Por ser los compañeros perfectos, por demostrarme que un laboratorio puede ser una familia, por sostenerme cuando flaquearon mis fuerzas, por secar mis lágrimas de vez en cuando y aguantar mis zafarranchos sin rechistar... gracias por cada café, cada caña... y por cada mojito que nos tomamos (y por los que vendrán); por amainar la tormenta en el momento apropiado y encender una luz en mi oscuridad y... sobre todo, ¡por ser mis Manga y Felpa! Os quiero un montón, creo que entre nosotros ya sobran las palabras.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Antonio Bernad, que me acogió en su laboratorio como una más cuando todo parecía perdido, gracias por darme una

oportunidad. A todo el departamento de Cardiología Regenerativa del CNIC, a la Unidad de Vectores Virales y a las niñas de citometría, Raquel y Elvira, cuánta paciencia... A Aída, Piedad, Juan Carlos, Bea, Alberto, Vane, Carmen, Enrique, Sandra... a todos, pero sobre todo a Candelas, que ha sido como una madre y una amiga. Nunca olvidaré tantos favores, lo prometo. A Miguel Aracil, por los cafés que compartimos en aquel lugar, nunca es tarde para conocer gente buena.

Si hay alguien que merece un enorme y mayúsculo GRACIAS POR TODO, ésa eres tú, Fe, nunca una sola sílaba definió tan bien a una persona. Gracias por creer en mí desde el principio, porque me tendiste la mano y nunca dejaste de guiarme en el camino que me ha traído aquí, a pesar de los baches que superamos, que superaste. Gracias por tu confianza, porque a tu lado aprendí a amar la ciencia y a no conformarme. Gracias porque con otro maestro jamás habría sido mejor discípulo. Aún me resisto a soltarme de tu mano y seguir adelante yo sola; afortunadamente, de esta tesis nació una amistad que se hizo más fuerte ante la adversidad, sé que siempre estarás ahí, al otro lado de unas risas o a una hora de teléfono. Nunca voy a olvidar que si soy algo es gracias a ti, te quiero muchazo.

Y por último y obviamente, porque eres lo más importante, Adamo, gracias por ser de verdad, porque cuando te soñaba no imaginé tanta felicidad. Gracias por ser mi aliento, mi compañero, mi mejor complemento. Gracias por sostenerme, por ser el eje de mi vida, por saber colorear mis días en blanco y negro, gracias por conocerme mejor que nadie en el mundo y aun así quererme tanto. Gracias por las tardes que aguantaste mi ausencia, por comprenderme a pesar de ser extranjero en el país de los laboratorios. Gracias por regalarme un motivo distinto cada día, por aprender a superarte y demostrarme que querer es poder.

En fin, gracias a todos porque, a vuestra manera, habéis contribuido a que esta tesis no se quedara en un mero proyecto. Gracias por haber compartido conmigo estos años de trabajo y por los que vendrán. Por cada palabra de aliento que me habéis regalado cuando lo necesité, y mira que fueron veces... MUCHAS TUNCIAS!

ABREVIATURAS

BER: *Base Excision Repair* (Reparación por escisión de bases)

CBS: Cistationina-β- Sintasa

CIMP: *CpG Island Methylator Phenotype* (Fenotipo Metilador de Islas CpG)

CRC: Cáncer colorrectal

DPD: Dihidropirimidina Deshidrogenasa

FACS: (citómetro)

FDA: *Food and Drug Administration* (Agencia de administración de fármacos y alimentos)

HDACi: Inhibidores de histona desacetilasas.

IP: Ioduro de Propidio

miARN: MicroARN

MMR: *Mismatch Repair System* (Sistema de reparación de bases incorrectamente apareadas)

MS: Metionina Sintetasa

MSI: *Microsatellite instability* (Inestabilidad de microsatélites)

MSP: PCR específica de metilación

MSS: *Microsatellite stability* (Sin inestabilidad de microsatélites)

MTHFR: Metilentetrahidrofolato reductasa

MTT: Sal de tetrazolio : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide

NER: *Nucleotide excision repair* (Reparación por escisión de nucleótidos)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la Poimerasa

qPCR: PCR cuantitativa

qRT-PCR: RT-PCR cuantitativa

QT: Quimioterapia

RFLP: Restriction Fragments Lenght Polymorphisms (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)

RT: Retrotranscripción

SAM: S-Adenosilmetionina (donador universal de grupos metilo)

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de un solo nucleótido)

TP: Timidina Fosforilasa

TS/TYMS: Timidilato Sintetasa

VNTR: *Variation Number Tandem Repeats* (Secuencias repetidas en Tandem de Número Variable)

SUMMARY

Comprehensive pharmacogenetic and epigenetic analysis and its prognostic value for 5FU/oxaliplatin-based chemotherapy response in order to define a molecular algorithm transferable to clinical practice

5-Fluorouracil (5-FU) is a widely used chemotherapeutic agent that inhibits cancer cell growth and initiates apoptosis by targeting *thymidylate synthase (TYMS)* and by direct incorporation of 5-FU metabolites into DNA and RNA. 5FU improves overall and disease-free survival of patients with colorectal, breast, H&N and aerodigestive cancers. The combination of 5FU with other chemotherapeutic agents such as Irinotecan, Tomudex and Oxaliplatin has improved response rates for advanced CRC from 40 to 50%. Despite these improvements, the success of 5-FU based cancer treatments is limited by *de novo* and acquired resistance to chemotherapies. Moreover, molecular drug resistance is complex. Consequently, the inspection of genetic factors that influence drug metabolism, toxicity, and efficacy has a valuable potential to improve treatment. Pharmacogenomics studies the role of those genetic or molecular factors that may be involved in the therapeutic or toxic response to drugs. This science is progressively acquiring more importance on individualized treatment of cancer. The metabolism of many drugs currently used in cancer treatment is actually well known. However, analyses to find metabolic or molecular abnormalities for an agent are not performed in the clinical routine. In addition to classic examples of low tolerance to chemotherapy, in which genetically predisposed patients show a severe toxicity or deficient response to some drugs because of mutations in enzymes related to their metabolism, there could be cases in which many different genetic determinants affect the tumour response or even patient survival. These cancer-predisposing genes can be common, low penetrance alleles found in normal populations, so that multiple low-penetrance alleles could be involved in heritable chemosensitivity. SNPs have been confirmed as predictive markers of treatment response, toxicity and survival in cancer patients. In addition, cancer cells are characterized by a generalized disruption of the DNA methylation pattern, involving a substantial decrease in the level of 5-methylcytosine jointly with regional hypermethylation of particular CpG islands.

We illustrate here a comprehensive genetic analysis to evaluate the predictive value of a set of polymorphisms and markers for 5FU-based chemotherapy clinical outcome. The final purpose is to evaluate their clinical significance in terms of the ease of clinical application and accordingly develop an algorithm for treatment optimisation to be implemented at the clinical setting.

The accompanying work looks at interactions between clinicopathological characteristics in colorectal tumours and their genotypes or epigenotypes. The commonly polymorphic genes of the key enzymes involved in the methyl-group metabolism are good candidates to study, as well as those enzymes directly related to 5-FU metabolism.. Further understanding of the molecular differences between tumor gene expression help explain some of the variation in patient

response. Moreover, it is our tool for defining gene expression patterns associated with 5FU-based chemotherapy response, and may provide basis for customised treatments.

Therefore, identification and evaluation of new molecular targets involved in 5FU resistance will allow improved scheduling regimes and development of novel agents, to improve the tumor response to cancer chemotherapy.

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

SUMMARY

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. Introducción a la biología del cáncer	3
1.2. Epigenética del cáncer	5
1.2.1. 5-metilcitosina y metilación	6
1.2.2. Epigenética y cáncer	7
1.2.2.1. Hipometilación del ADN en cáncer	9
1.2.2.2. Hipermetilación en islas CpG	10
1.2.2.3. Fenotipo metilador de islas CpG (CIMP)	10
1.3. Biología molecular del cáncer colorrectal	10
1.3.1. Grado de diferenciación tumoral	
1.3.2. Estadíos tumorales en cáncer colorrectal	13
1.3.3. Parámetros biológicos implicados en la prognosis del cáncer	14
1.3.4. Parámetros moleculares implicados en la prognosis del cáncer colorrectal	14
1.3.4.1. Inestabilidad de microsatélites (MSI)	14
1.4. Tratamiento quimioterapéutico del cáncer	15
1.5. Farmacogenética	16
1.6. 5-Fluorouracilo (5-FU)	18
1.6.1. Timidilato Sintasa (TYMS)	20
1.6.1.1. Polimorfismos de TYMS	21
1.6.1.2. Alteraciones en los transportadores de nucleótidos	23
1.6.1.3. Expresión nuclear de la Timidilato Sintetasa	23
1.6.2. Ruta catabólica del 5-FU: DIHIDROPIRIMIDINA DESHIDROGENASA (DPD)	24
1.6.3. Ruta anabólica del 5-FU: TIMIDINA FOSFORILASA (TP)	25
1.6.4. Ruta del folato	26
1.6.4.1. Metilentetrahidrofolato Deshidrogenasa (MTHFR)	26
1.6.4.2. Metionina Sintasa (MS) y Cistation-β-sintetasa (CBS)	27
1.6.5. Otros mecanismos de resistencia al 5-Fluorouracilo	28
1.6.5.1. El factor de transcripción E2F-1	28

1.6.5.2. Gen supresor tumoral p53	29
1.6.5.3. Ganancias y/o pérdidas alélicas: alelic imbalance	31
1.7. El oxaliplatino	31
1.7.1. Mecanismo de acción del oxaliplatino	32
1.7.2. Mecanismos de resistencia	34
1.7.2.1. GSTP1	34
1.7.2.2. Sistemas de reparación del ADN	34
1.7.2.2.1. XPD (Xeroderma Pigmentosum D)	36
1.7.2.2.2. XRCC1 (Nucleotide Excision Repair Cross Complementing)	36
1.7.2.2.3. XRCC3	37
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1. LÍNEAS CELULARES	44
3.1.1. Curvas de crecimiento de líneas celulares	
3.1.2. Tratamiento de las líneas celulares con 5-Fluorouracilo/Oxaliplatino	46
3.1.2.1. Análisis de la CITOTOXICIDAD/VIABILIDAD de las células tratadas con 5-Fluorouracilo y Oxaliplatino	46
3.1.2.1.1. Análisis de citotoxicidad por MTT	47
3.1.2.1.2. Ensayos de inhibición de crecimiento (IG50)	47
3.1.2.1.3. Ensayos clonogénicos	48
3.1.2.1.4. Análisis de citotoxicidad y apoptosis mediante citometría de flujo	48
3.1.2.2. Análisis de apoptosis por TÚNEL	49
3.1.3. Patrón del ciclo celular de las células tratadas con 5-Fluorouracilo y Oxaliplatino	50
3.1.4. Análisis de la expresión de ARNm en células tratadas con 5-FU/oxaliplatino por RT-PCR cuantitativa	51
3.1.4.1. Extracción de ARNm	51
3.1.4.2. RT	51
3.1.4.3. qPCR	51
3.1.5. Cuantificación de ARNm	52
3.1.6. Análisis de los niveles proteicos en células tratadas con 5-FU/oxaliplatino	52

3.1.6.1. Inmunoquímica	52
3.1.6.2. Western Blot	53
3.1.7. Análisis del genotipo de los genes del metabolismo del 5-Fluorouracilo, genes reparadores y detoxificantes	54
3.1.8. Análisis del estado de metilación de las islas CpG en líneas celulares	54
3.1.8.1. MSPs (Methylation Specific PCR/PCR específica de metilación)	54
3.1.8.2. Determinación del contenido total de 5-metilcitosina en el ADN	55
3.2. Muestras tumorales procedentes de pacientes	56
3.2.1. Extracción de ácidos nucleicos de las muestras humanas	56
3.2.1.1. Extracción de ADN	56
3.2.1.2. Extracción de ARN	57
3.2.2. Análisis de Inestabilidad de Microsatélites (MSI)	58
3.2.3. Análisis del genotipo de los genes del metabolismo del 5-Fluorouracilo, genes reparadores, detoxificantes y del metabolismo de grupos metilo	58
3.2.4. Análisis del estado de metilación de las islas CpG	59
3.2.4.1. Tratamiento con bisulfito sódico	60
3.2.4.2. PCR específica de metilación (MSP)	60
3.2.4.3. Determinación del contenido total de 5-metilcitosina en el ADN	61
3.2.5. Expresión de ARNm de TS y DPD en muestras tumorales de pacientes	61
3.2.5.1. Retrotranscripción /Trascricpción Inversa (RT)	61
3.2.5.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	61
3.3. Análisis estadístico	62
4. RESULTADOS	63
4.1. RESULTADOS I: Líneas celulares	65
4.1.1. Caracterización de la sensibilidad de las líneas celulares	67
4.1.1.1. Ensayo de MTT y de inhibición del crecimiento para determinar los índices de 5-FU IC50 e IG50 en cada línea celular	67
4.1.1.2. Ensayos MTT para medir sensibilidad a 5-FU en líneas celulares de colon cultivadas en medios pobres en folato	69
4.1.2. Genotipado de líneas celulares	70

4.1.3. Estado de metilación de islas CpG en líneas celulares	71
4.1.3.1. Patrones de metilación de islas CpG en líneas celulares	73
4.1.3.1.1. <i>Patrones de metilación de TYMS, TP y DPYD</i>	74
4.1.3.2. Análisis de las variantes genéticas en líneas celulares de cáncer humano de los genes del metabolismo de grupos metilo en los perfiles de metilación del ADN	76
4.1.4. Análisis de la CITOTOXICIDAD/VIABILIDAD de las células tratadas con 5-Fluorouracilo y Oxaliplatino	
4.1.4.1. Ensayo de citotoxicidad de 5-Fu en líneas celulares mediante tinción con IP/Anexina V y FACS	77
4.1.4.2. Apoptosis producida por el tratamiento con 5-FU en líneas celulares de colon	82
4.1.5. Patrón de ciclo celular en líneas celulares tras la exposición a 5-Fluorouracilo y Oxaliplatino	83
4.1.5.1. Variaciones en la ploidía celular en líneas celulares expuestas a 5-Fluorouracilo/Oxaliplatino	88
4.1.6. Análisis de la expresión de ARNm en células tratadas con 5-FU/oxaliplatino por RT-PCR cuantitativa	90
4.1.6.1. Análisis de la expresión de ARNm <i>in vitro</i> mediante qRT-PCR	91
4.1.6.1.1. <i>Relación entre la expresión de ARNm y proteína TYMS en líneas celulares</i>	91
4.1.6.1.2. <i>Polimorfismos asociados con la expresión de ARNm en líneas celulares tratadas con 5-FU/oxaliplatino</i>	91
a. <i>Variación en los niveles de ARNm de TYMS según el tiempo de exposición a la droga en presencia o ausencia del alelo 3G</i>	92
b. <i>Variación en los niveles de ARNm de MTHFR según el tiempo de exposición a la droga en presencia o ausencia del alelo 677T</i>	93
4.1.6.1.3. <i>Estado de p53 y su expresión en líneas celulares</i>	95
4.1.6.1.4. <i>Comparación entre los niveles de expresión de ARNm de los genes TYMS, TP, DPYD, MTHFR, P53, E2F1 y RFC en líneas celulares tumorales tratadas con diferentes dosis de 5-FU</i>	96

4.1.6.1.5. Variación en los niveles de expresión de ARNm asociada con el tiempo de exposición a 5-FU	98
a. Expresión de TYMS y E2F1 a las 24,48,72 horas de tratamiento y 72 horas después del tratamiento	99
b. Expresión de TP y DPYD a las 24,48,72 horas de tratamiento y 72 horas después de haber retirado el tratamiento	101
4.1.7. Análisis de la expresión proteica de TYMS in vitro en líneas celulares tratadas con 5-FU/oxaliplatino	103
4.1.7.1. Análisis de la expresión proteica por Inmunocitoquímica	103
4.1.7.2. Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot	105
4.1.7.2.1. Timidilato Sintetasa	105
4.1.7.2.2. El complejo ternario (5-FU + TYMS + 5,10-MTHF)	106
4.1.7.2.3. p53	107
4.2. RESULTADOS II: Pacientes	109
4.2.1. Caracterización de los tumores en relación con factores clinicopatológicos	111
4.2.2. Evaluación de la respuesta y toxicidad en pacientes de cáncer colorrectal tratados con quimioterapia basada en 5-FU/Oxaliplatino	113
4.2.3. Estudio de interacción entre las distintas variables clinicopatológicas y polimorfismos presentes en tumores colorrectales	114
4.2.3.1. Influencia de los polimorfismos génicos y sus interacciones en las características clinicopatológicas del tumor	116
4.2.3.1.1. Análisis de polimorfismos en genes que participan en la ruta metabólica del 5-FU (TYMSER y TYMS-3'UTR) en la población de tumores	116
a. Asociación entre variantes genéticas de TYMS presentes en el tejido tumoral y características clinicopatológicas del mismo	117
b. Comparación de las variantes genéticas encontradas en tejido tumoral y su correspondiente línea germinal	120
4.2.3.1.2. Análisis de polimorfismos en genes que participan en la ruta metabólica del grupo metilo (MTHFR, MS y CBS) en la población de tumores	121
4.2.3.1.2.1. Asociación entre variantes genéticas de MTHFR presentes en el tejido tumoral y características clinicopatológicas del mismo	123

4.2.3.1.2. <i>Análisis del estado de p53</i>	125
4.2.3.1.3. <i>Análisis de polimorfismos en genes de reparación del ADN y genes detoxificantes</i>	125
4.2.3.2. Interacción entre los distintos polimorfismos	127
a. <i>Interacción entre los distintos polimorfismos que afectan a genes del metabolismo de grupos metilo</i>	127
b. <i>Interacción entre los polimorfismos en genes del metabolismo de grupos metilo con los niveles de folato en sangre</i>	128
c. <i>Interacción entre los polimorfismos en genes del metabolismo de grupos metilo con el estado de metilación de islas CpG en promotores de genes supresores de tumores</i>	128
d. <i>Interacción entre los distintos polimorfismos que afectan al gen de la Timidilato Sintetasa</i>	129
 4.2.4. Análisis de expresión de genes implicados en la ruta metabólica del 5-FU	 130
4.2.4.1. Expresión de ARNm de la Timidilato Sintetasa (TYMS) en tumores	130
4.2.4.2. Expresión de ARNm de la Dihidropirimidina Deshidrogenasa (DPYD) en tumores	131
4.2.5. Análisis del estado de metilación de los tumores colorrectales	132
4.2.5.1. Perfil de hipermetilación de islas CpG en tumores primarios humanos	132
4.2.5.2. Frecuencia de metilación de islas CpG en los tumores colorrectales en relación con la respuesta al tratamiento basado en 5-FU	133
4.2.6. Concordancia en el estado de metilación y asociación con MSI (Microsatellite Instability/Inestabilidad de microsatélites) y MMR (Mismatch Repair /sistema de reparación de apareamientos erróneos)	135
4.2.7. Caracterización epigenética de líneas celulares y tumores primarios	136
4.2.7.1. Determinación del contenido en 5-mC en tumores humanos y sus correspondientes tejidos normales	136
4.2.7.2. Determinación del estado de metilación en tumores humanos vs líneas celulares	137

4.2.8. Asociación entre el contenido de 5-mC y porcentaje de hipermetilación de islas CpG en tumores y respuesta al tratamiento con 5-FU	138
4.2.9. Susceptibilidad genética a la metilación aberrante del ADN	138
4.2.9.1 Análisis de la relevancia de las variantes en tumores de los genes del metabolismo de grupos metilo y su asociación con parámetros de metilación del ADN analizados	138
<i>4.2.9.1.1 Genotipado de los polimorfismos de genes implicados en metabolismo de grupos metilo y relación con el estado de metilación del tumor en pacientes de cáncer colorrectal</i>	141
<i>4.2.9.1.1.1. Polimorfismos MTHFR, CBS y MS vs hipermetilación islas CpG de genes de ciclo celular y reparación del ADN.</i>	142
4.2.10. Caracterización epigenética de los diferentes tumores colorrectales y sus consecuencias en relación con la respuesta a quimioterapia basada en 5-FU	142
4.2.10.1. Análisis exhaustivo del estado de metilación de islas CpG en promotores de genes característicos del fenotipo metilador (CIMP)	143
<i>4.2.10.1.1. Estado de metilación de p14, p16 y genes de la familia MINT</i>	143
<i>4.2.10.1.2. Estado de metilación de MGMT</i>	145
<i>4.2.10.1.3. Estado de metilación de hMLH1 e Inestabilidad de Microsatélites (MSI)</i>	146
4.2.10.2. Fenotipo metilador y localización del tumor en cáncer colorrectal	148
5. DISCUSIÓN	149
5.1. DISCUSIÓN I: Líneas celulares	151
5.1.1. Determinación de la sensibilidad a 5-FU en líneas celulares de colon mediante ensayos de MTT y clonogénicos	153
5.1.1.1. Efecto de los niveles de ácido fólico en el medio sobre la sensibilidad a 5-FU en líneas celulares de colon	153
5.1.2. Genotipado de líneas celulares establecidas de cáncer humano	154
5.1.3. Sensibilidad y respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo/oxaliplatino en líneas celulares establecidas de cáncer humano	155
5.1.3.1. Niveles de citotoxicidad en líneas tratadas con 5-FU/oxaliplatino	156
5.1.3.2. Patrones de ciclo celular en líneas tratadas con 5-FU/oxaliplatino	159

5.1.3.2.1. Efecto beneficioso del oxaliplatino en la terapia basada en 5-Fluorouracilo	160
5.1.3.2.2. El papel que desempeña p53 en la parada del ciclo celular	160
5.1.3.2.3. Ciclo celular y expresión génica	162
5.1.3.2.4. Variaciones en la ploidía celular en líneas celulares expuestas a 5-Fluorouracilo/Oxaliplatino	163
5.1.4. Perfiles de metilación en las líneas celulares analizadas	164
5.1.4.1. Relación entre polimorfismos en genes del metabolismo de grupos metilo y patrón de metilación de líneas celulares	166
5.1.4.2. Patrones de metilación de los genes implicados en la ruta metabólica del 5-FU: TYMS, TP y DPYD	167
5.1.5. Polimorfismos genéticos y expresión de ARNm y proteína de las enzimas que participan en la respuesta a 5-FU. Valor pronóstico de respuesta y sensibilidad al tratamiento	168
5.1.5.1. Niveles de ARNm de MTHFR en líneas celulares tratadas con 5-FU	168
5.1.5.1.1. Asociación entre los niveles de expresión de ARNm de MTHFR y metilación de islas CpG	170
5.1.5.2. Niveles de ARNm de TYMS en líneas celulares tratadas con 5-FU	170
5.1.5.2.1. Asociación entre los niveles de expresión de ARNm de TYMS y E2F1	171
5.1.5.2.2. Asociación entre los niveles de expresión de ARNm de TS y TP	171
5.1.5.2.3. Asociación entre los niveles de expresión de ARNm de TS y DPD	172
5.1.5.3. Correlación entre los niveles de ARNm y proteína de TYMS	172
5.1.5.4. Expresión nuclear de TYMS	173
5.1.5.5. Correlación entre los niveles de ARNm y proteína de TYMS y p53	174
5.2. DISCUSIÓN II: Pacientes	177
5.2.1. Caracterización de los tumores atendiendo a factores clinicopatológicos e influencia de estos factores en la respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo	179
5.2.1.1. Influencia de factores clinicopatológicos y parámetros moleculares de los tumores sobre la respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo	181

5.2.1.1.1. Localización y estadio	181
5.2.1.1.2. El efecto de la dieta sobre la respuesta a 5-FU	182
5.2.1.1.3. Inestabilidad de microsatélites (MSI)	184
5.2.2. Caracterización epigenética de los tumores e influencia de la hipermetilación aberrante en la respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo	185
5.2.2.1. Fenotipo metilador (CIMP)	185
5.2.2.2. MGMT	187
5.2.3. Respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo/oxaliplatino según el perfil genético del tumor	189
5.2.3.1. Efecto de los polimorfismos de la Timidilato Sintetasa en la respuesta y tolerancia a 5-Fluorouracilo en pacientes de cáncer colorrectal	190
5.2.3.2. Polimorfismos en genes de la ruta del folato y su efecto en el patrón de metilación normal en tumores colorrectales	195
5.2.3.3. Inestabilidad de Microsatélites (MSI)	197
5.2.3.4. Patrones de metilación en cáncer de colon	198
6. CONCLUSIONES	201
7. BIBLIOGRAFÍA	205
8. ANEXOS	227

I. INTRODUCCIÓN

1.1.INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER

La carcinogénesis es un proceso a través del cual una célula evade los mecanismos de control de crecimiento normales y se divide de forma acelerada (por un aumento de proliferación y/o por inhibición de los procesos de muerte celular) para generar una progenie celular clonal. En última instancia, provoca la pérdida de la homeostasis celular que garantiza el equilibrio en la relación con su microentorno. Estas células adquieren capacidad invasiva (proceso conocido como metástasis) que les permite colonizar y proliferar en otros tejidos dañándolos y provocando tumores (Muñoz., 1997).

La transformación de una célula normal en tumoral, conlleva una pérdida del control social de la proliferación, es decir, las células tumorales proliferan a densidades elevadas puesto que pierden la inhibición por contacto y la capacidad de responder a factores inhibidores del crecimiento. Este estado de malignidad se produce como consecuencia de la acumulación progresiva de defectos en el genoma, que contribuyen, en su conjunto, a la generación y progresión tumoral. La gran mayoría de los tipos tumorales presenta una enorme variedad de funciones génicas alteradas, incluyendo la activación de genes promotores del crecimiento así como el silenciamiento de genes con funciones supresoras del mismo. Todas estas alteraciones colaboran en el desencadenamiento de un crecimiento celular descontrolado (Jones et al., 1999. Jones et al., 2002).

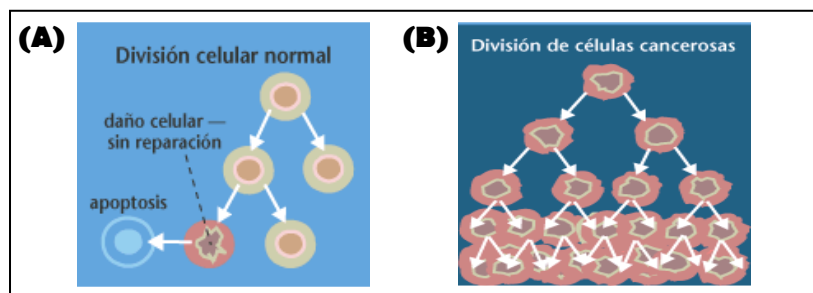


Figura 1. (A) División de una célula normal. Cuando se produce algún tipo de daño irreparable, la célula entra en apoptosis. **(B)** División de una célula cancerosa. La célula dañada continúa su proceso de división y pierde la inhibición por contacto.

Las células disponen de mecanismos de control o *checkpoints*, que actúan controlando la normalidad de la progresión del ciclo celular. Cuando estos sistemas de control detectan alguna anomalía, detienen el ciclo, activando mecanismos de reparación, y, en el caso de no poder resolver el problema, desencadenan la muerte celular programada o **apoptosis** (Figura 1A). Sin embargo, las células tumorales se caracterizan por la pérdida de funcionalidad de al menos uno de estos *checkpoints*, permitiendo la acumulación de errores

en el ADN, lo que conduce a la inestabilidad genética propia de estas células. Estos sistemas de control inducen la apoptosis celular ante cualquier anomalía, alteración de la homeostasia celular, ataque contra la integridad celular, etc. Aunque los sistemas de control deberían inducir la apoptosis de estas células, su alteración impide que se lleve a cabo el proceso de muerte celular (Figura 1 B). Por tanto, la pérdida de control de proliferación en combinación con la falta de funcionalidad de los *checkpoints*, permite perpetuar células proporcionándoles la capacidad de formar tumores

El ADN genómico contiene el núcleo central de la información genética de la célula, que está dictada por el orden secuencial de las cuatro bases: adenina, guanina, citosina y timina. Las alteraciones de la secuencia original y la modificación de las bases nitrogenadas, contribuyen a la definición de los patrones de expresión génica. La regulación anormal de la proliferación en las células cancerosas se origina por la acumulación de mutaciones en genes claves que inducen o inhiben diferenciación, senescencia o muerte celular (Weinberg, 1996).

Existen numerosos tipos de alteraciones que contribuyen, directa o indirectamente, a la progresión tumoral. Por ejemplo: translocaciones cromosómicas, cambios genéticos en la secuencia del ADN celular (deleciones, inserciones, amplificaciones, mutaciones puntuales y polimorfismos), cambios epigenéticos, etc. La variación en genes o polimorfismos genéticos son diferentes de las mutaciones. Los polimorfismos y mutaciones comparten características morfológicas, tales como sustituciones de nucleótidos y deleciones, pero la diferencia conceptual reside en la incidencia. Según algunos autores, cuando la variación se observa en menos del 1% de la población general, se llama mutación. Cuando esta variación se observa en más del 1% de la población general, entonces se habla de polimorfismo (Balasubramanian et al., 2004).

Los polimorfismos de un nucleótido (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*) son la forma de variación genética más común, y se estima que suponen más del 90% de esta variación en humanos (Liu et al., 2005; Crawford DC., 2005; Crawford DC., 2005-b). La mayoría de estas variaciones no tienen repercusión fenotípica a nivel clínico.

Existen otros tipos de variaciones polimórficas muy frecuentes como VNTR (*Variation Number Tandem Repeats/ Secuencias repetidas en Tandem de Número Variable*) o STR (Short Tandem Repeat/ Repeticiones en tandem cortas).

Las VNTR son secuencias simples repetidas en tandem que suelen tener entre 10 y 80 pares de bases. Son altamente polimórficas y muy frecuentes en el genoma. Tienden a agregarse en los extremos teloméricos de los cromosomas.

Las STR o microsatélites, consisten en secuencias mucho más cortas (2-10 pb) cuyas variantes alélicas se repiten en tandem cientos de veces en los diferentes loci. Son la herramienta ideal como marcador genético por su gran diversidad, amplia distribución y polimorfismo.

Todas estas variaciones afectan a la actividad enzimática, pero los SNPs tienen cierto efecto acumulativo, por lo que pueden tener, además, repercusión clínica.

1.2. EPIGENÉTICA DEL CÁNCER

El término **epigenética** hace referencia a aquellos cambios hereditarios en las pautas de expresión génica que están mediados por mecanismos ajenos a la modificación de la secuencia nucleotídica primaria de un gen. Esta forma de almacenamiento de información es suficientemente flexible para adaptarse a distintos tipos de células somáticas, y suficientemente estable para mantenerse tras los procesos de mitosis y meiosis.

Las alteraciones epigenéticas, principalmente la metilación del ADN y las modificaciones post-traduccionales de histonas, se reconocen actualmente como mecanismos adicionales que contribuyen al fenotipo maligno. Los patrones aberrantes de metilación del ADN son una de las alteraciones moleculares encontradas más frecuentemente en las neoplasias humanas. A diferencia de las alteraciones genéticas, las modificaciones epigenéticas no alteran la secuencia del ADN, son reversibles y, sin embargo, son hereditarias y están implicadas en la regulación de la transcripción génica.

Actualmente, existe un interés creciente en comprender los mecanismos moleculares que subyacen a estos cambios durante el desarrollo tumoral. Cada vez existen más evidencias que muestran que estas alteraciones epigenéticas actúan junto con las alteraciones genéticas para favorecer la tumorigénesis (Antequera et al., 1990).

Por otro lado, las mutaciones que conducen al desarrollo neoplásico, afectan a tres tipos de genes:

- a) los **proto-oncogenes**, cuya función es regular positivamente la proliferación celular. La adquisición de mutaciones los convierte en oncogenes, y su activación constitutiva promueve la transformación tumoral;
- b) los **genes supresores de tumores (GST)**, que regulan negativamente la proliferación y cuya pérdida de función también promueve la carcinogénesis;
- c) los **genes reparadores del ADN**, responsables de corregir los errores producidos durante la replicación del ADN y de reparar las alteraciones inducidas en esta molécula por agentes mutagénicos externos (radiación UV y agentes químicos). Las alteraciones en estos genes conducen a la aparición de múltiples mutaciones en el genoma que acaban afectando a oncogenes y GST. Este hecho favorece la carcinogénesis.

1.2.1. 5-METILCITOSINA Y METILACIÓN

La modificación epigenética más conocida es la metilación del ADN. Ésta se caracteriza por una dualidad en tumores: hipermetilación en islas CpG en zonas reguladoras e hipometilación global del genoma. Al hallazgo inicial de la hipometilación global del ADN en tumores humanos, pronto le siguió la identificación de genes supresores de tumores hipermetilados y, más recientemente, el descubrimiento de la inactivación de genes de microARN mediante metilación del ADN (Baylin, 2004).

La metilación del ADN juega un papel crítico en el control de la actividad génica y la complejidad del núcleo de la célula. En humanos, la metilación tiene lugar en citosinas que preceden a guaninas, llamadas dinucleótidos CpG, aunque también se ha descrito metilación en secuencias CpNpG, CpA y CpT, en una frecuencia mucho menor. Se produce como resultado de la adición enzimática de un grupo metilo del donante de grupos metilo S-adenosilmetionina (SAM) al carbono 5' de la citosina, tras la síntesis de ADN (Doerfler et al., 1983) (Figura 2).

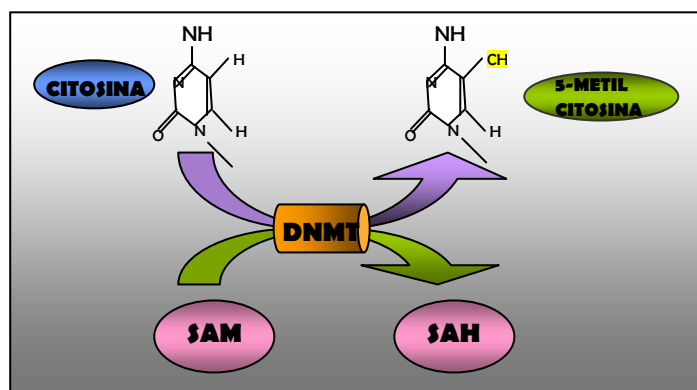


Figura 2. Mecanismo de metilación. Las ADN-metiltransferasas (DNMT) transfieren un grupo metilo procedente del donante universal (SAM) al carbono 5' de la citosina normal. Por tanto, ésta se convierte en 5-metilcitosina (5-mC)

La frecuencia general de CpG en el genoma es significativamente menor que la que se esperaría estadísticamente. Algunos investigadores postulan que la baja frecuencia de citosinas metiladas en el genoma se debe a que son propensas a sufrir desaminación. Se forman entonces timinas que si no se reparan, permanecen en el genoma como mutaciones C por T. Parece probable que la metilación, junto con la gran capacidad mutagénica de las citosinas metiladas, sean los responsables de la eliminación progresiva de los dinucleótidos CpG del genoma a lo largo del tiempo (Bird., 1986). La extinción de dinucleótidos CpG en el genoma se asocia directamente con sitios en los que se han producido tales transiciones como

resultado del alto potencial mutagénico de la 5-metilcitosina. Este cambio es el tipo más común de polimorfismo genético en la población humana (Rideout et al., 1990).

El dinucleótido CpG no está distribuido al azar en el genoma, sino que hay regiones ricas en CpG, conocidas como islas CpG, repartidas de forma heterogénea y que comprenden el 1-2% del genoma total. Estas islas CpG son fragmentos de entre 200pb y varias kilobases de longitud. Tienen una elevada densidad de dinucleótidos CpG que se acerca más a la esperada y que, generalmente, coinciden con los sitios de iniciación a la transcripción. No obstante, llegan a extenderse desde la región promotora hasta el primer exón e incluso hasta el primer intrón (Antequera et al., 1993). Las islas CpG también son frecuentes en secuencias repetitivas: satélites, secuencias de ADNr y centroméricas (Baylin et al., 2001. Esteller et al., 2002). Esta hipermetilación de secuencias genómicas repetitivas, probablemente previene la inestabilidad cromosómica, translocaciones y disrupción de genes causadas por la reactivación de secuencias de ADN transponibles (Bestor., 2005).

En el genoma de la célula normal, alrededor del 80% de los dinucleótidos CpG no asociados a islas se encuentran metilados. Mientras, los que forman parte de ellas, especialmente si están asociados a promotores, suelen estar no metilados (Bird et al., 1992) (Figura 3). La excepción a esta generalidad la constituyen los genes silenciados transcripcionalmente en el cromosoma X inactivo de las hembras en mamíferos (Reik W et al., 2005), y los alelos silenciados de genes imprintados, que mediante una hipermetilación en uno de los dos alelos parentales, están programados para asegurar la expresión monoalélica (Feinberg et al., 2002). Por otro lado, se ha encontrado que algunas islas CpG se metilan con el envejecimiento celular (Brandeis et al., 1994, Klein et al., 1991. Macleod et al., 1984).

La metilación del ADN es también una de las claves en el control de ciertos genes específicos de tejido, que están silenciados en todos los tejidos excepto en tumores malignos (Bodey., 2002).

1.2.2. EPIGENÉTICA Y CÁNCER

El desarrollo tumoral se apoya en el efecto acumulativo de alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a un crecimiento celular desregulado, lo que amenaza gravemente el equilibrio homeostático celular. Determinadas alteraciones particulares podrían conferir ventaja selectiva a la célula tumoral:

- A través de la resistencia a terapias, al aumentar las señales positivas de crecimiento mediante la activación de oncogenes,
- mediante la eliminación de señales inhibitoras o limitantes del crecimiento, por medio de la inactivación de genes supresores de tumores (Bird et al., 2002).

- mediante la inhabilitación de los mecanismos de reparación de errores en el ADN, lo que contribuiría activamente a la acumulación de lesiones que promuevan el desarrollo tumoral

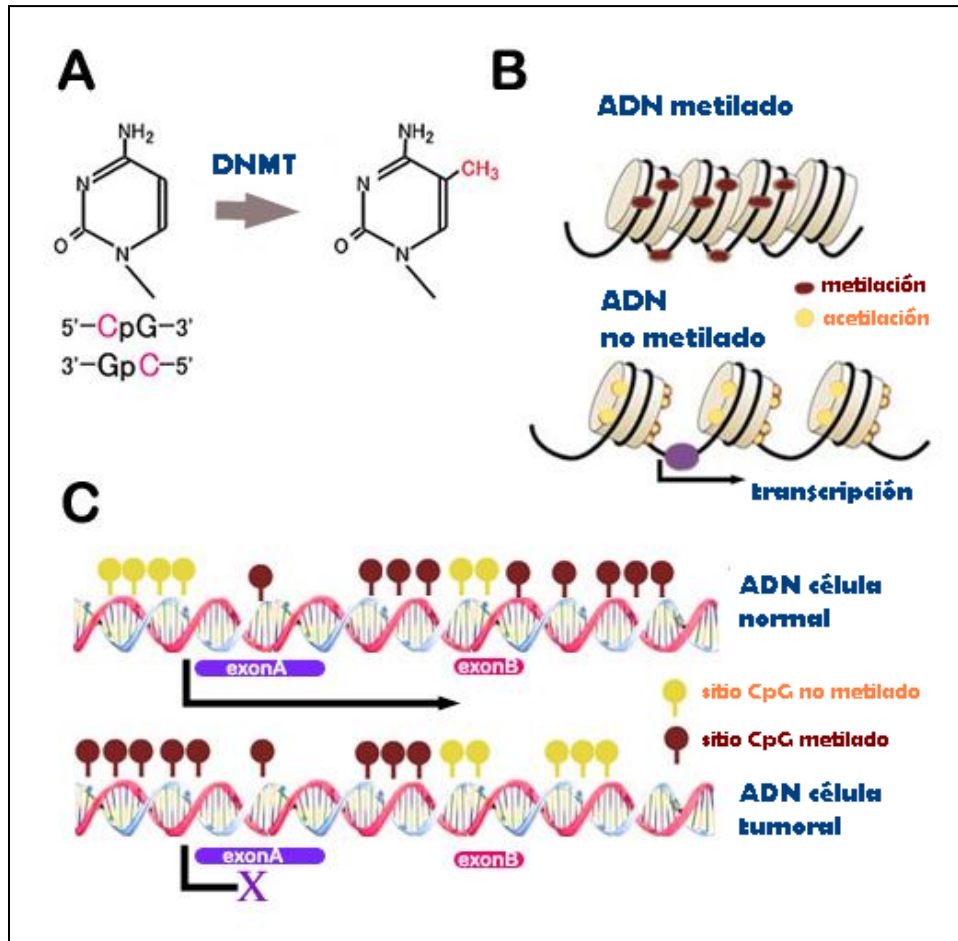


Figura 3. Desregulación de la metilación del ADN en cáncer. Típica isla CpG de un gen supresor de tumores representada en una célula normal y en una célula tumoral. La presencia de una densa hipermetilación cambia completamente su contexto molecular.

Son dos las alteraciones que afectan fundamentalmente a los patrones normales de metilación que coexisten en una misma célula tumoral. Estas alteraciones están estrechamente relacionadas con la desregulación de la actividad metiltransferasa característica en los tumores (Figura 3). Además, confieren dualidad en el patrón de la metilación en células tumorales:

- **Pérdida global de metilación del genoma:** principalmente en regiones no asociadas a islas CpG en la secuencia codificante de los genes y en secuencias repetitivas. Posiblemente está relacionada con la inestabilidad cromosómica y con la reactivación de secuencias endoparasitarias.

- **Hipermetilación en islas CpG de regiones promotoras:** relacionada con el silenciamiento transcripcional de la secuencia regulada por dicha región: genes supresores de tumores, microARNs, *enhancers*, promotores, etc.

Ambos sucesos de hipo e hipermetilación se producen en sitios diferentes en el genoma de la célula tumoral y no de forma aleatoria. Las distintas etiologías se asocian a esta dualidad característica del cáncer en general, sin embargo, están definidas por el perfil de metilación aberrante. El origen principal de esta manifestación dual de la metilación en el genoma es la pérdida o alteración de los mecanismos de regulación de las DNMTs (ADN metiltransferasas). Los dos defectos pueden preceder a la transformación maligna, lo que indica que no son simplemente una consecuencia del estado de malignidad (Tycko et al., 2000). Si las alteraciones del estado de metilación contribuyesen directamente a la iniciación del tumor, dichas modificaciones deberían ocurrir en estadios tempranos del proceso canceroso o en células premalignas. Si, por otro lado, la alteración contribuyese directamente a la progresión tumoral, los defectos de metilación aumentarían en frecuencia y/o severidad de forma coordinada con el aumento en el grado de malignidad. Es de esperar, en el mismo sentido, que las células que acumulen anomalías importantes en la metilación en cuanto a funcionalidad, puedan ser seleccionadas de acuerdo a la evolución clonal de las células tumorales (Novell et al., 1976).

1.2.2.1 Hipometilación del ADN en cáncer

El nivel de hipometilación global del genoma está estrechamente relacionado con el grado de malignidad, aunque depende del tipo de tumor. Por tanto, podría servir como marcador biológico con valor pronóstico.

Se ha propuesto que la pérdida global de la metilación podría tener al menos tres consecuencias: la activación transcripcional de oncogenes por la hipometilación del ADN (Feinberg et al., 1983, Holliday et al., 1975), activación de retrotransposones latentes (Alves et al., 1996, Bestor et al., 1996) e inestabilidad cromosómica (Erlich et al., 2000). Recientemente, se ha descrito el papel de la desmetilación en la reactivación de secuencias correspondientes a miARN, habitualmente silenciadas (Lujambio et al., 2007).

Algunos estudios parecen señalar que tanto la hipometilación del ADN como la inestabilidad cromosómica podrían asociarse a una ingesta insuficiente de folatos con la dieta (Kim et al., 1997). El folato proporciona unidades de carbono para diversas reacciones bioquímicas, entre ellas la producción de S-adenosilmetionina (SAM), el donador universal de grupos metilo, que también provee de grupos metilo a las citosinas en el ADN. También parece existir una relación entre la escasez de folatos y cáncer (Fowler et al., 1998). No obstante, aún no es posible vincular la hipometilación generada por una deficiencia de

folatos y el cáncer, aunque todos los estudios apoyan la importancia de una dieta rica en folatos para reducir el riesgo de ciertos tipos tumorales (Kim et al., 1999).

1.2.2.2 Hipermetilación en islas CpG

La hipermetilación aberrante de islas CpG en las regiones reguladoras génicas se asocia con un silenciamiento transcripcional anómalo, y se presenta como un mecanismo de inactivación de genes supresores de tumores, además de las mutaciones. Hace algunos años, se comprobó que para anular la función de un gen supresor de tumores era necesaria la pérdida funcional completa de las dos copias de dicho gen (Knudson, 2000). La hipermetilación anormal del promotor de un gen puede provocar el mismo efecto que una mutación en la región codificante de esa copia del gen. En tumores esporádicos, se observa que esta metilación aberrante de las islas CpG puede inactivar ambos alelos en determinados genes asociados a cáncer, o puede colaborar con otros mecanismos genéticos como mutaciones o deleciones. En cáncer familiar, las alteraciones epigenéticas no aparecen como mecanismo de inactivación de la primera copia, pero sí pueden ocasionar el segundo suceso de inactivación (Esteller et al., 2001).

1.2.2.3 Fenotipo metilador de islas CpG (CIMP)

El fenotipo metilador de islas CpG (CIMP+) se ha descrito como una característica de tumores que tienden a presentar inactivación epigenética de ciertos genes supresores de tumores. Los carcinomas colorrectales CIMP+, están caracterizados por hipermetilación concordante de las islas CpG de múltiples promotores y resultados clinicopatológicos peculiares (Toyota et al., 1999). Los tumores considerados CIMP positivos en este estudio son los que tienen al menos dos loci metilados de entre *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}*, *MGMT*, *MINT1*, *MINT2* y *MINT31*. Habitualmente estos tumores suelen asociarse con una mala respuesta clínica (Ward, 2003; Samowitz, 2005). Las investigaciones realizadas hasta la fecha han estipulado que los carcinomas con fenotipo metilador positivo suelen presentar inestabilidad de microsatélites (MSI), localización proximal, predisposición en mujeres, alta frecuencia de mutación del protooncogen *BRAF* y baja frecuencia de mutación del protooncogen *KRAS*.

1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal es una de las principales causas de mortalidad en los países occidentales (Figura 4). Tiene una incidencia de 150.000 casos nuevos al año en EEUU y

170.000 en Europa. El 90% de los casos suele ser esporádico y sólo un 10% corresponde a síndromes familiares.

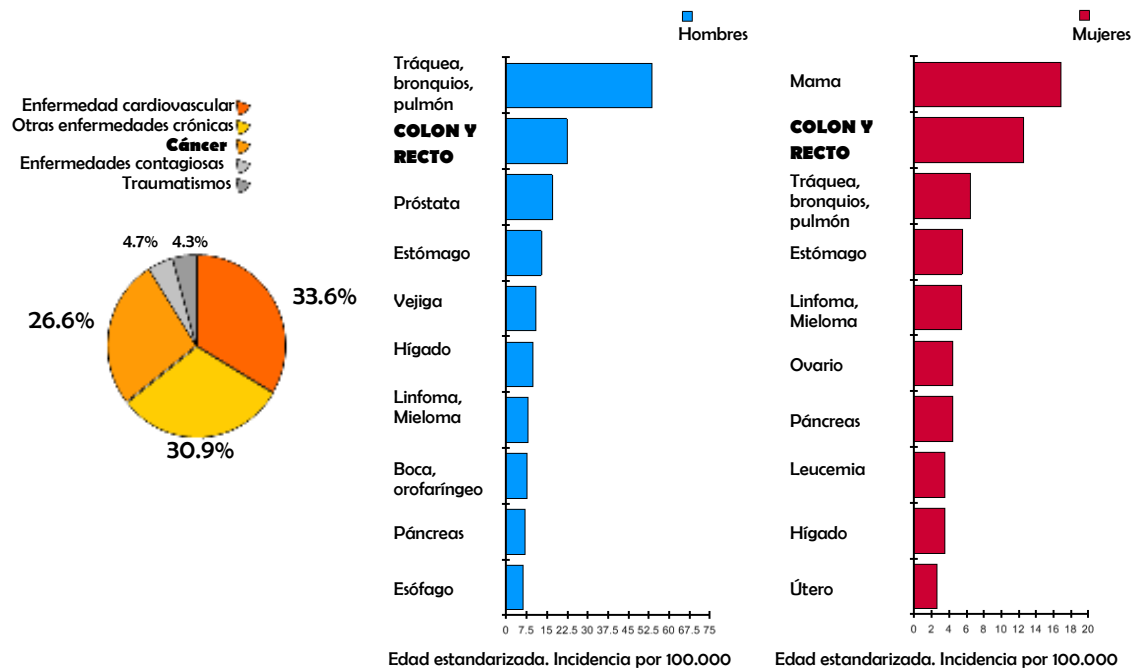


Figura 4: (A) Principales causas de muerte en España en 2005. (B) Incidencia de los diferentes tipos de cáncer con causa de muerte en España en 2005 en hombres y (C) mujeres. (Datos actualizados de la OMS). Se observa que el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en nuestro país. Y el cáncer colorrectal es el segundo tipo tumoral más frecuente tanto en hombres como en mujeres.

La progresión de esta enfermedad desde un epitelio colorrectal normal al fenotipo maligno está asociada con diversas alteraciones genéticas y epigenéticas (Figura 5). Algunos estudios indican que los componentes de la dieta en países occidentales son factores principales en la aparición de esta enfermedad. El calcio y la vitamina D ya son prometedores agentes quimiopreventivos, y también existe una relación inversa entre la dieta rica en folato y el riesgo de carcinogénesis colorrectal (Lamprecht et al., 2003).

Aunque la resección quirúrgica es la terapia principal en pacientes con la enfermedad localizada, la práctica estándar es la quimioterapia adyuvante, particularmente en aquellos individuos con nódulos linfoides positivos. A pesar de que el 60-65% de pacientes se curan sólo con intervención quirúrgica, y la quimioterapia adyuvante reduce en un 30% la mortalidad de aquellos que habrían recaído, aproximadamente un tercio de los pacientes tratados son diagnosticados finalmente de enfermedad recurrente (Allegra et al., 2003).

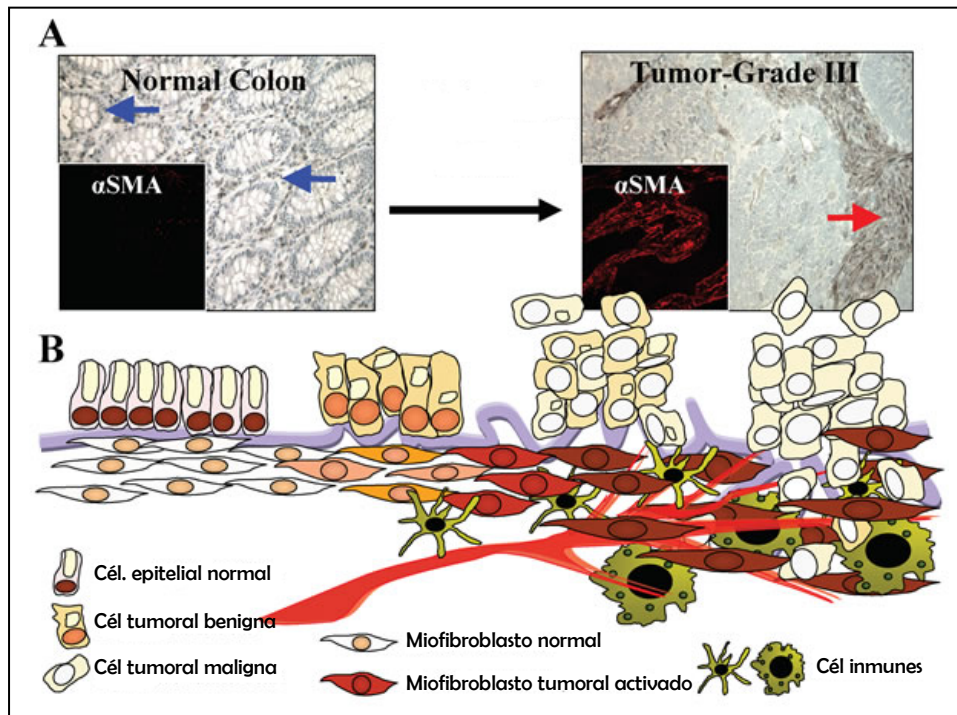


Figura 5. Modificaciones en el epitelio y estroma colorrectales directamente correlacionadas con la progresión tumoral. **(A)** Inmunotinción de CLIC4 (Canal intracelular de cloruro 4). En colon normal muestran localización predominante en núcleo. Por el contrario, CLIC4 es excluido del epitelio tumoral en cáncer de colon avanzado y sobreexpresado en el estroma tumoral cuando se coexpresa con actina muscular (α SMA). **(B)** Diagrama de las modificaciones recíprocas de CLIC4 (representado en color marrón) en células epiteliales y fibroblastos del estroma en el curso del desarrollo del cáncer. (Suh et al., 2007)

1.3.1. Grado de diferenciación tumoral

El término "diferenciado" describe hasta qué punto las células cancerosas son similares a las células saludables del mismo tipo de tejido en apariencia y función. El grado de diferenciación generalmente se relaciona con el comportamiento clínico de un tumor en particular. La gradación histológica es un sistema de clasificación usado por los patólogos para describir el grado de diferenciación de las células del tumor. Basados en la apariencia microscópica de las células cancerosas, los patólogos normalmente describen la histología del tumor en cuatro grados de severidad: Grados 1, 2, 3, y 4. Las células de grado 1 son por lo general tumores bien diferenciados o tumores de bajo grado, y generalmente se consideran como los de comportamiento menos agresivo. Por el contrario, las células de los tumores de grado 3 ó 4 son tumores precariamente diferenciados o tumores de alto grado no diferenciados, y generalmente son los de comportamiento más agresivo.

La Comisión del Cáncer Americana (*The American Joint Commission on Cancer*) ha recomendado las siguientes pautas en la gradación de los tumores:

Grado

- GX** El grado no puede evaluarse (calidad indeterminada)
- G1** Bien diferenciado (calidad baja)
- G2** Moderadamente bien diferenciado (calidad intermedia)
- G3** Precariamente diferenciado (calidad alta)
- G4** no diferenciado (calidad alta)

1.3.2. Estadios tumorales en cáncer colorrectal

Existen actualmente diferentes escalas para clasificar los tumores en función de su estadio. El estadio de los tumores colorrectales en este estudio se realizó mediante la clasificación de Duke, que es una de las habitualmente más empleadas (Figura 6):

Estadio A: Tumor no penetrante en la pared intestinal

Estadio B: Tumor penetrante en la pared intestinal sin metastasis en nódulos linfoides

Estadio C: Tumor penetrante en la pared intestinal con metástasis en nódulos linfoides de la misma región

Estadio D: Tumores que se han extendido a lugares distantes (por ejemplo, hígado).

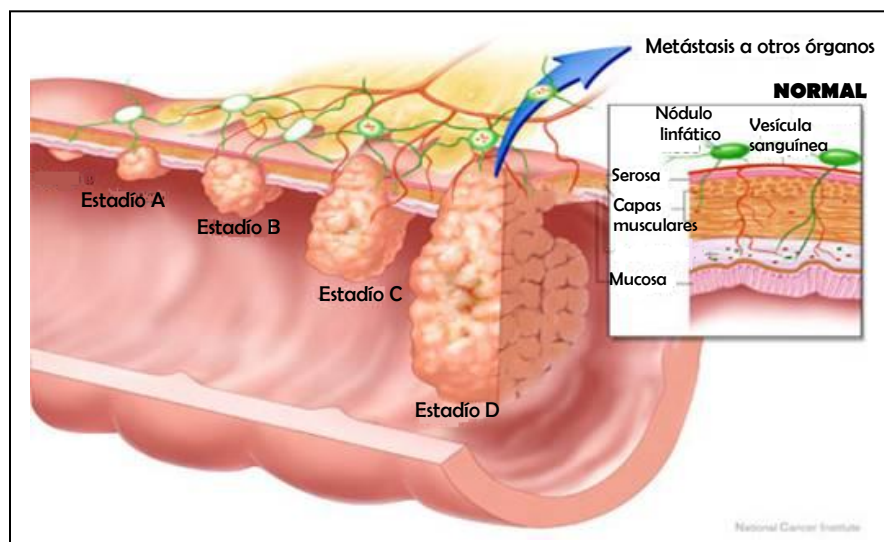


Figura 6: El adenocarcinoma surge de células glandulares que se alinean en la pared interior del colon y a medida que se va diferenciando y colonizando nódulos linfáticos u otros órganos se clasifica como estadios más avanzados.

1.3.3. Parámetros biológicos implicados en la prognosis del cáncer

La prognosis de la mayoría de los tipos de cáncer, principalmente el colorrectal, está influenciada por una variedad de factores presentes ya en el momento del diagnóstico. Algunos de estos factores son: edad, sexo, presencia de síntomas, localización del tumor, tipo de dieta, antecedentes familiares y algunos hábitos (Abad., 2000, Mcleod et al., 1999).

Ciertas características tumorales como la vascularización, la invasión linfática, la ploidía y los niveles en plasma del CEA (antígeno carcinoembrionario), que son también marcadores tumorales, del mismo modo se consideran factores pronóstico (Wolmark et al., 1983; Hermanek., 1995), si bien hasta la fecha, no se ha descrito ninguno infalible.

Afortunadamente, los avances en la biología molecular así como en el conocimiento de los mecanismos de acción de los diferentes fármacos antineoplásicos, han puesto de manifiesto la relación de determinados factores moleculares y biológicos con las diferentes características de las células tumorales: la agresividad, la capacidad de proliferación y la diferenciación tumoral, la migración, la adhesión y la capacidad de invasión, la capacidad apoptótica, las funciones inmunes y la respuesta al tratamiento. Todo esto ha permitido definir robustos marcadores de progresión tumoral.

1.3.4. Parámetros moleculares implicados en la prognosis del cáncer colorrectal

1.3.4.1. Inestabilidad de microsatélites (MSI)

Aproximadamente el 75-85% de los tumores colorrectales surgen de una inestabilidad cromosómica, caracterizada por aneuploidía, pérdidas alélicas, amplificaciones, traslocaciones y mutación de *APC*, *KRAS* y *p53* (Vogelstein et al., 1988). Aunque el pronóstico de pacientes con CRC MSS (*Colorectal Cancer Microsatellite Stable* / Cáncer colorrectal sin inestabilidad de microsatélites) depende del estadio y del grado del tumor, entre otros factores, las mismas características morfológicas producen una heterogeneidad considerable en términos de respuesta clínica. Alrededor de 15-20% de CRCs tienen alta frecuencia de inestabilidad de microsatélites (*MicroSatellite Instability-High, MSI-H*), que viene caracterizada por la inactivación de genes del sistema de reparación de apareamientos incorrectos, *Mismatch repair (MMR)* (Jass et al., 2002). Los casos esporádicos con MSI-H son consecuencia del silenciamiento por metilación del gen *hMLH1* y se asocian con una frecuencia elevada de metilación aberrante (Kinzler et al., 1996). La condición hereditaria autosómica dominante del cáncer colorrectal no polipósico (HNPCC) parece suceder en un 5-15% de CRCs y presenta generalmente MSI-H debido a mutaciones en uno de los genes MMR (Weisenberg et al.,

2006). Los tumores con MSI-H tienden a estar localizados en la zona proximal, pobremente diferenciados, el tipo histológico característico es mucinoso, muestran una considerable infiltración linfocítica y se asocian con mutaciones en *TGFBRII* y *BRAF* (Alexander et al., 2001; Gafa et al., 2000; Greenson et al., 2003; Jass et al., 1998; Kim et al., 1994; Malesci et al., 2007; Smyrk et al., 2001; Ward et al., 2001; Baker et al., 2007). Recientemente, el grupo investigador de MsPath ha postulado que el estado MSI-H se asocia con predisposición hereditaria en CRC. Esta predicción se basa en características clinicopatológicas como la edad en el momento del diagnóstico, localización anatómica del tumor, subtipo histológico y grado tumoral (Malesci et al., 2007). Unos autores postulan que la ausencia de inestabilidad de microsatélites en CRC es un factor que se asocia con una mejor supervivencia en terapia adyuvante con 5-FU (Ribic et al., 2003). Otros publican justamente lo contrario, es decir, que los tumores colorrectales con inestabilidad de microsatélites son más sensibles a la terapia y se benefician de mayor supervivencia (Brueckl et al., 2003). Aun así, las evidencias sugieren que los tumores con inestabilidad de microsatélites pueden ser más resistentes a este tratamiento (Benatti et al., 2005; Bendardarf et al., 2007).

1.4. TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO DEL CÁNCER

La quimioterapia es uno de los pilares básicos en el tratamiento de los pacientes de cáncer con tumores agresivos o malignos. Uno de cada tres pacientes no responde correctamente a la terapéutica farmacológica prescrita. Además, individuos distintos muestran diferentes respuestas a los mismos fármacos, tanto en términos de eficacia como en toxicidad (Levi et al., 1997). La resistencia a drogas es el principal problema en cuanto a efectividad de los tratamientos quimioterapéuticos utilizados para combatir el cáncer puesto que los tumores pueden ser resistentes a la quimioterapia de forma intrínseca antes del tratamiento. Este tipo de resistencia puede ser debida a factores farmacocinéticos (una rápida aclaración, mala absorción o la insuficiente distribución de la droga) o a propiedades de la propia célula tumoral (modificación de las dianas celulares o alteración de las rutas de reparación del ADN) (Plasencia et al., 2000). No obstante, la resistencia puede ser adquirida durante el tratamiento en tumores que inicialmente eran sensibles y obtienen nuevas características que les hacen resistentes al tratamiento (Longley et al., 2005). Al mismo tiempo, los tumores no sólo se hacen resistentes a los fármacos utilizados inicialmente, sino que pueden adquirir resistencia a otras drogas con distinto mecanismo de acción (resistencia cruzada). La resistencia a estas drogas, ya sea intrínseca o adquirida, es la causa del fallo del tratamiento en el 90% de los pacientes con cáncer metastático. Las células tumorales micrometastáticas resistentes pueden también empobrecer la respuesta a quimioterapia adyuvante.

Una de las causas de fracaso terapéutico es la manifestación severa de toxicidad tras el tratamiento. Por ello, algunos pacientes sufren crueles efectos secundarios sin ningún beneficio terapéutico. Por ello, la predicción precisa de la seguridad y eficacia de un fármaco anticancerígeno es una de las principales metas en la investigación para combatir el cáncer.

La resistencia a la quimioterapia limita enormemente la efectividad de los fármacos antitumorales. Además, el gran potencial citotóxico intrínseco de estos agentes, y su empleo en las dosis máximas toleradas, convierten a los tratamientos de quimioterapia en procedimientos de alto riesgo, especialmente para aquellos pacientes que se desvían de la media de la población en lo que respecta a la respuesta al tratamiento. Actualmente, se sabe que la variabilidad entre individuos en la respuesta a la quimioterapia es, en gran medida, hereditaria (Salonga et al., 2000). Conjuntamente, ha de tenerse en cuenta la heterogeneidad de las células tumorales tanto dentro del propio tumor como entre el tumor primario y las metástasis, ya que esta heterogeneidad dificulta enormemente el tratamiento. Atendiendo al hecho de que los tumores están compuestos por subpoblaciones celulares con diferentes características morfológicas funcionales, es posible observar diferencias importantes en cuanto a genotipo y fenotipo en dichas subpoblaciones. Esta heterogeneidad tumoral tiene implicaciones a nivel morfológico y diagnóstico que permiten explicar porqué tumores de la misma histología responden de manera diferente en distintos pacientes. Incluso dentro del mismo paciente, unas células tumorales responden mejor que otras al tratamiento.

La peor de las consecuencias de esta heterogeneidad celular es la resistencia a fármacos. De acuerdo con la teoría de *Goldie y Coldman (1979)* basada en resistencias bacterianas, la probabilidad de que un tumor albergue células resistentes en su interior, depende del tamaño del tumor y de la frecuencia de mutación. Aunque exista una buena respuesta inicial a la quimioterapia, la expansión clonal de las células resistentes origina la pérdida de sensibilidad al tratamiento. En este caso, los fármacos actuarían como *agentes seleccionadores* que eliminan la población sensible y favorecen la selección de células resistentes.

1.5. FARMACOGENÉTICA

La **farmacogenética** es la ciencia que permite identificar las bases genéticas, moleculares y metabólicas de las diferencias interindividuales en la respuesta a drogas.

El metabolismo de cada droga generalmente se conoce bastante a fondo. Sin embargo, los análisis para ver si existen anomalías metabólicas para un determinado agente (farmacogenética) no se realizan de rutina. Este hecho se debe, en parte, a que los individuos afectados suponen un pequeño porcentaje de la población, mientras que el coste es bastante elevado. Pero es de gran beneficio clínico el conocer esas reacciones para determinar su etiología y saber cuándo es necesario realizar un estudio genético (farmacogenética).

Además, la sobreexpresión de ciertas dianas y las alteraciones en los sistemas de reparación del ADN también influyen en la actividad antitumoral de las drogas (farmacogenómica). (Nguyen H et al., 2006).

La Farmacogenética estudia el papel de los determinantes genéticos en la respuesta terapéutica o tóxica a los fármacos, y está adquiriendo progresivamente mayor protagonismo en el tratamiento individualizado del cáncer. Esta ciencia puede conseguir que más de la mitad de las respuestas inadecuadas puedan ser previstas y evitadas. Además de los ejemplos clásicos de baja tolerancia a quimioterapia, en los que pacientes predispuestos genéticamente manifiestan una toxicidad severa ante ciertos fármacos por presentar mutaciones en enzimas implicadas en su metabolismo, podrían existir casos en los que determinantes genéticos afectaran a la respuesta tumoral al tratamiento e incluso a la supervivencia del paciente (Jakob et al., 2004, Pinedo et al., 1998).

El objetivo último de la farmacogenética es la obtención del perfil farmacogenético del paciente, que permita valorar *a priori* qué medicamento muestra el equilibrio óptimo entre su nivel de eficacia y el riesgo de producirle efectos secundarios. Para ello es necesaria la sustitución del actual sistema empírico de ensayo y error en la selección y dosificación de los medicamentos. Para ello se basa en la disponibilidad de técnicas genéticas y moleculares potentes y fiables. La farmacogenética puede cambiar la forma de recibir quimioterapia de los pacientes en un futuro próximo. Asimismo, el análisis de los posibles determinantes genéticos implicados en la sensibilidad a fármacos antitumorales puede ser realizado, en muchos casos, en tejido normal de fácil acceso, como sangre periférica, además de en el propio tejido tumoral (Raymond et al., 1998).

Los últimos avances en Farmacogenética establecen como hipótesis de trabajo la necesidad de clasificar a los individuos en función de sus genotipos relacionados con la acción de los fármacos. El mismo medicamento no tiene siempre idéntico efecto en todos los pacientes, puesto que sus células son distintas. Esta heterogeneidad se refleja tanto en su toxicidad como en su eficacia terapéutica. Sin embargo, la respuesta a los medicamentos no sólo está relacionada con la herencia monogénica de una proteína. Depende de genes que codifican proteínas implicadas en múltiples vías metabólicas, modificaciones postraduccionales, interacciones génicas, epigenéticas, etc.

Estudios recientes demuestran que la estratificación farmacogenética de los pacientes sería capaz de identificar subgrupos con mayor fiabilidad en cuanto al perfil pronóstico, que el obtenido únicamente con los parámetros clínicos y patológicos habituales (Grem et al., 2001, Johnson et al., 1997, Saito et al., 1999). La presencia de alelos asociados con una respuesta reducida a ciertos fármacos podría promover la selección de terapias alternativas adaptadas a cada individuo, al ajustar la dosis para la máxima eficacia minimizando la toxicidad. En cierto modo, estas directrices mejorarían el cuidado de los

pacientes y reducirían enormemente los costes sanitarios innecesarios, ambos objetivos muy deseables.

Actualmente ya existen ejemplos prácticos en los que se seleccionan pacientes a través de la farmacogenética para un determinado tratamiento. Por ejemplo, en el caso de pacientes con cáncer colorrectal metastático, se realiza una selección de aquellos que tienen *k-Ras* mutado como potenciales respondedores a la terapia con anticuerpo monoclonal anti-EGFR (Allegra et al., 2008).

1.6. EL 5-FLUOROURACILO (5-FU)

El 5-Fluorouracilo es una fluoropirimidina “antimetabolito”, análogo de un sustrato metabólico natural de la célula, bastante consolidado como agente antitumoral desde hace más de 40 años (Figura 7). Tanto las células normales como las tumorales metabolizan el 5-FU a FdUMP y FUTP, conocido por sus efectos citotóxicos (Nguyen et al., 2006). En la ruta metabólica del 5-FU, las reacciones anabólicas y catabólicas engloban diversas enzimas, por lo que la resistencia se puede producir a muchos niveles: incremento en la expulsión de la droga, inactivación de la misma, alteración de sus dianas moleculares, mayor tasa de reparación del daño provocado o evasión de la apoptosis (Etienne et al., 1995).

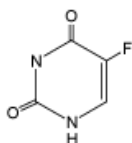


Fig. 7. Estructura molecular del 5-Fluorouracilo

El 5-FU puro es muy tóxico, por lo que habitualmente es administrado como capecitabina (Xeloda), que tiene mayor biodisponibilidad para la célula. Se introduce en ésta a través de la membrana plasmática mediado por transportadores de nucleósidos. Tiene dos vías principales de acción a través de sus metabolitos activos 5-fluoro-2´deoxiuridina-5´monofosfato (**FdUMP**) y 5-fluoroUTP (**5-FUTP**) (Figura 8). Cuando es administrado por vía oral o por bolo, actúa a través del metabolito 5-FUTP, que se incorpora al ARNm intracelular, lo que conlleva su disfunción e inhibición de la síntesis de proteínas (Danenberget al., 1977).

La segunda vía de actuación del 5-FU, cuando es administrado por infusión continua, es a través de su otro metabolito activo, FdUMP, que es un inhibidor de la Timidilato Sintetasa (Figura 8). Una de las consecuencias de esta vía es la disminución de los niveles de metilación celulares. Este metabolito también puede ser fosforilado a FdUTP e incorporado directamente al ADN. Esta incorporación errónea inhibe la elongación de la cadena y altera su estabilidad, lo que resulta en la producción de roturas de una hebra y fragmentación del ADN (Falcone et al., 1998; Otake et al., 1999).

Es necesario resaltar que el 5-FU es un fármaco antitumoral que actúa principalmente en la **fase S** del ciclo celular. Esto se debe a que su enzima diana, la Timidilato Sintasa, tiene su mayor nivel de expresión en esta fase, que es donde se sintetiza el ADN. El tratamiento con 5-FU produce roturas en el ADN (principalmente de doble hebra o *Double Strand Breaks*) durante la fase S debido a la incorrecta incorporación de su metabolito activo FdUTP (Curtin, 1991; Peters, 2000). Estudios recientes han demostrado que un gran porcentaje de células cancerosas resistentes a 5-FU de líneas establecidas humanas, están retenidas en fase G0-G1 o en el límite G1-S (Grem et al., 2001).

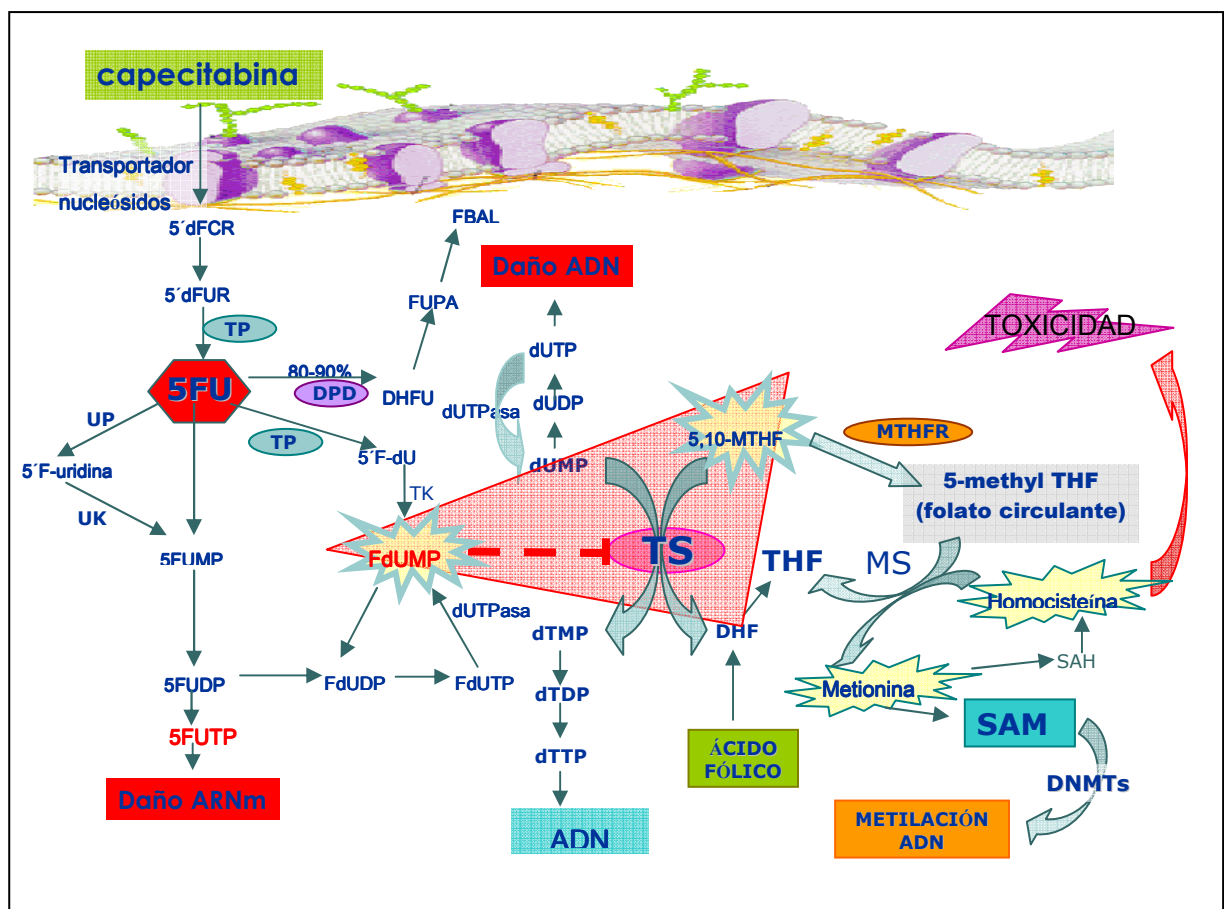


Figura 8. Ruta metabólica del 5-FU: ruta metabólica del folato y de la metilación global del ADN. El 5-FU entra en la célula por transportadores de nucleósidos. Aproximadamente un 80-90% es catabolizado por DPD y expulsado de la célula. El resto, puede incorporarse como 5-FUTP al ARNm, lo que inhibe la síntesis de proteínas; o puede ser activado por TP. El metabolito activo, FdUMP, inhibe a TS (una enzima limitante en la síntesis de timidina) utilizando como cofactor al sustrato de MTHFR, 5,10-MTHF. Esto provoca que se acumule el sustrato de dUMP, y, en último término, la incorporación errónea de dUTP al ADN. Por otro lado, la enzima MTHFR no puede sintetizar folato y esto afecta a la ruta de síntesis de SAM, donador universal de grupos metilo. Por tanto, se deplecionan los niveles de folato intracelular y se desregulan los mecanismos de metilación celulares.

Los esquemas de quimioterapia basados en 5-FU mejoran la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad de pacientes con cáncer colorrectal, mama, cabeza y cuello y del tracto aerodigestivo. Sin embargo, las tasas de respuesta no superan el 20-25% y difieren bastante entre los pacientes, lo que constituye uno de los principales obstáculos para el éxito clínico de estos tratamientos (Diasio et al., 2000). Actualmente no existen mecanismos prospectivos capaces de identificar a aquellos pacientes que se beneficiarían del tratamiento con 5-FU. Dicho tratamiento es, además, una opción moderadamente efectiva, ya que muchos pacientes no responden o no mejoran tras una breve respuesta. En estos casos, se requiere una opción de quimioterapia de segunda línea más efectiva. La modulación bioquímica con ácido folínico así como los regímenes de infusión de 5-FU permiten mejorar la respuesta al tratamiento, aunque no representan un beneficio claro en términos de supervivencia.

Cada vez es más frecuente el uso combinado de distintas quimioterapias para el tratamiento de tumores. La biomodulación del 5FU por agentes como el ácido folínico o el metotrexato también favorecen las tasas de respuesta. Recientemente, los ensayos de combinación con nuevos fármacos que presentan un mecanismo de acción distinto, como Irinotecán, inhibidor de la Topoisomerasa I análogo de Camptotecina, o el Oxaliplatino, derivado del platino, muestran tasas de respuesta de hasta el 50% (Raymond et al., 1998). Algunos de ellos como Tomudex, Capecitabina, Tegafur o UFT (Rustum YM et al., 1999) y otros menos desarrollados como MTA y BOF-2, entre otros, son inhibidores de la Timidilato Sintasa (TS) como el 5-FU (Papamichael., 2000). No obstante, además del incremento en el coste asociado a estos regímenes, la combinación de estos fármacos supone un incremento considerable en la toxicidad y en la mortalidad asociada al tratamiento.

1.6.1 TIMIDILATO SINTASA (TYMS)

La **Timidilato Sintasa (TS)**, codificada por un gen que tiene su locus en el cromosoma 18p, es una enzima dimérica citosólica que cataliza la metilación reductiva de deoxiuridina-5' monofosfato (dUMP) a deoxitimidina-5' monofosfato (dTMP). En esta reacción, un grupo metilo del cofactor 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF) se transfiere a la posición 5 del anillo de la pirimidina, procurando la única fuente de novo de dTMP (timidina), nucleótido necesario para la síntesis de ADN (Figura 8). Por tanto, es una enzima limitante en la ruta de síntesis *de novo* del ADN y una atractiva diana para drogas de inhibición. En los últimos 40 años se han desarrollado múltiples fármacos que inhiben esta enzima o su sustrato (dUMP) ensamblándose en el lugar de unión del cofactor (folato). El FdUMP compite con el dUMP y, en presencia de los niveles adecuados de poliglutamatos de cadena larga de 5,10-MTHF, atrapa a la enzima TS en un complejo ternario (Figura 9).

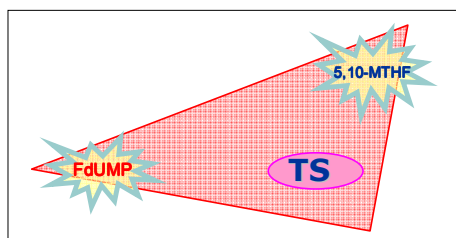


Figura 9. Complejo ternario formado por la enzima TS, el metabolito FdUMP y el sustrato de MTHFR, 5,10-MTHF

El bloqueo de TS provoca una depleción de dTMP y, por tanto, de dTTP y una acumulación de dUMP que es incorporado al ADN produciendo errores, rotura de hebras y, finalmente, muerte celular. En esas condiciones, el FdUTP también puede ser incorporado erróneamente al ADN (Danenberget al., 1977). Esto puede contribuir a la acumulación de errores en el ADN, ruptura de hebra, etc.

1.6.1.1 Polimorfismos de TS

Diferentes estudios han mostrado que los niveles de expresión de *TYMS* en tumores varían considerablemente y que la sensibilidad de algunos tipos tumorales a quimioterapias basadas en 5-FU se asocian con los niveles intratumorales de *TYMS* (Huang et al., 2000, Nishimura et al., 1999, Salonga et al., 2000, Heh et al., 1998). Por esta razón es imprescindible comprender el mecanismo de regulación de la expresión de esta enzima para desarrollar una estrategia quimioterapéutica más efectiva desde el punto de vista clínico utilizando inhibidores de la misma.

Se han descrito, en el *enhancer* de la región promotora de *TYMS* (***TYMSER***), diversos polimorfismos diferentes, pero dos de ellos son los más frecuentes. El primero es un polimorfismo *VNTR* que consiste en dos o tres repeticiones (***TYMSER*2*** ó ***TYMSER*3***) en tandem de una secuencia de 28 pares de bases (Figura 10). El otro polimorfismo es un *SNP* común en el decimosegundo nucleótido de la segunda repetición en el alelo 3R, que consiste en una transversión del nucleótido C por G y se asocia con un nivel de expresión de *TYMS* 2.6 veces superior al del alelo 2R, tanto *in vitro* como en el tumor (Horie et al, 1995). Los pacientes homocigotos para la triple repetición (3R/3R) presentan un nivel de actividad enzimática de TS de 2 a 4 veces mayor que los pacientes homocigotos para la doble repetición (2R/2R). Esos estudios sugieren que la secuencia repetida tiene un papel decisivo en el control de la expresión proteica de *TYMS*, y que la longitud de la secuencia repetida afecta a estos mecanismos de control (Kazuyuki et al., 2001). Conjuntamente, se ha demostrado que el alelo 3G se asocia con los niveles más elevados de expresión de esta enzima. Otros autores han comprobado que los genotipos portadores de este alelo responden peor a la quimioterapia basada en 5-FU que los que no lo tienen (Marcuello et al., 2004).

El mecanismo de acción de esta región aún no está claro, sin embargo, la primera copia de la repetición es necesaria para la formación de un *loop* de contención alrededor del inicio de traducción ATG y al menos una copia de la repetición es necesaria para que la transcripción tenga lugar (Kaneda., 1992, Marsh., 2005). Además, datos recientes sugieren que hay un dominio de unión USF1 presente en las repeticiones, lo que conllevaría un incremento en la cantidad de estos lugares de unión USF1 al aumentar el número de repeticiones, y finalmente, un incremento de la transcripción del gen. Asimismo, algunos autores han concluido que las dos primeras repeticiones corriente arriba de la tercera repetición, tienen un efecto inhibitorio en cuanto a la eficiencia de traducción del ARNm de *TYMS* y que la tercera repetición tiene un efecto activador. Este efecto inhibitorio de las dos primeras repeticiones no sería otra cosa que la formación de una estructura secundaria en *loop* por asociación de la secuencia repetida invertida dentro de la secuencia tandem (Takeishi., 1989, Kaneda., 1990, Villafranca et al., 2001).

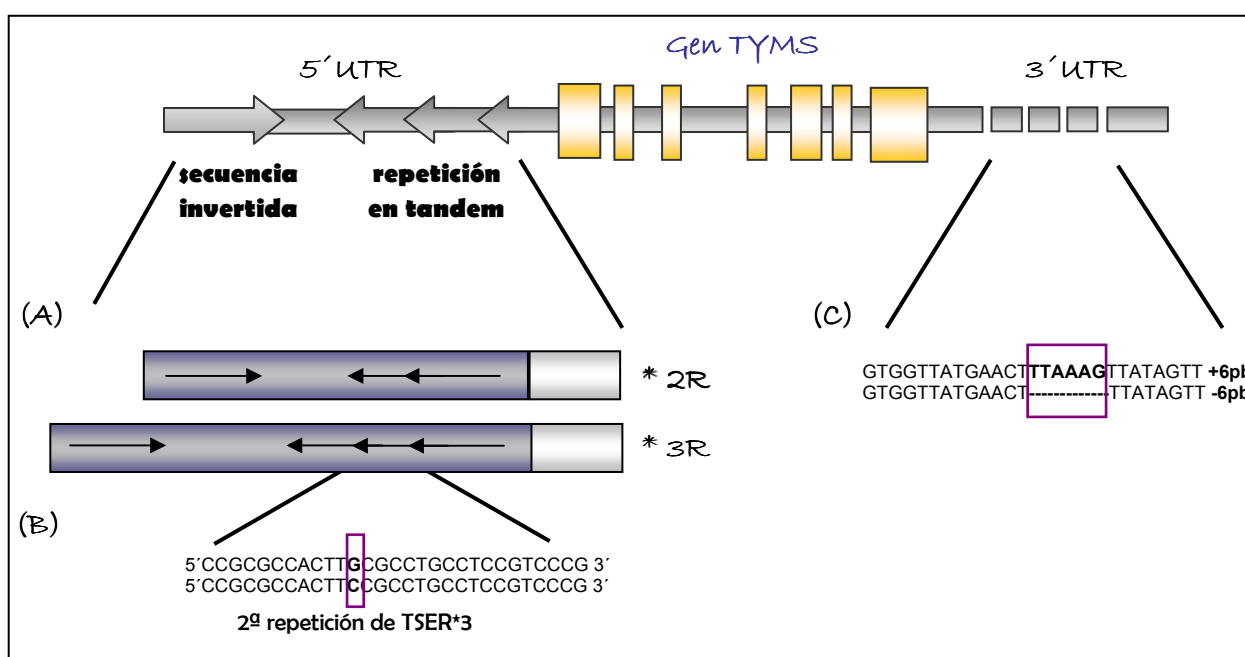


Figura 10. Polimorfismos en el gen de la Timidilato Sintasa: **(A)** TSER, El polimorfismo de 3 repeticiones (3R) se asocia con mayor eficacia en la traducción de ARNm a proteína que el de dos repeticiones (2R). **(B)** *TYMSER*3* G> C SNP, El alelo 3G se asocia con los niveles más elevados de expresión de la enzima y con resistencia a quimioterapia basada en 5-FU. **(C)** *TYMS* del. La deleción de la secuencia de 6pb induce inestabilidad en el ARNm, por lo que se asocia con menor actividad enzimática.

Por otro lado, en la posición 1494 de la región **3'UTR** de este mismo gen, existe una variación de 6 pares de bases, que consiste en una deleción de este pequeño fragmento (Figura 10). Parece ser que el haplotipo 6pb también puede estar relacionado con los niveles

de expresión de la enzima TS y con los dos polimorfismos encontrados en el promotor (Lecomte et al., 2004). 3'UTR modula la regulación del gen a nivel postranscripcional a través del control de la estabilidad del ARNm. El polimorfismo -6pb se asocia con una reducción en la estabilidad del ARNm *in vitro* y una expresión reducida de la proteína TS en el tejido tumoral en cáncer colorrectal (Mandola et al., 2004). Se ha demostrado que el genotipo *TYMSE*R está estrechamente relacionado con la toxicidad y eficacia al 5-FU. Por consiguiente, se podría esperar que los polimorfismos, a través de su influencia en el nivel de expresión, repercutieran sobre la respuesta clínica al tratamiento con quimioterapias basadas en 5-FU (Iacopetta et al., 2001).

1.6.1.2 Alteraciones en los transportadores de nucleótidos

El 5-FU entra en la célula mediante el sistema de transporte de bases púricas no dependiente de energía. La inhibición de *TYMS* por el 5-FU provoca una disminución en los niveles de timidina. Sin embargo, en la célula existen otras fuentes de timidina aparte de la síntesis *de novo*. Algunos investigadores han observado un incremento en la actividad enzimática de la Timidina quinasa en las células tumorales respecto al tejido normal. Esta manifestación indica la importancia en los tejidos tumorales de las vías de rescate para la subsiguiente síntesis del ADN (Patterson., 1998).

Existen evidencias del incremento de la actividad del transporte de nucleósidos en un 22-39% como consecuencia de la inhibición continuada de *TYMS* en una línea tumoral derivada de cáncer de vejiga (Pressaco., 1995). Dicho incremento, tanto en los sistemas de transporte facilitado como no facilitado, provee de timidina a la célula, por un aumento en los niveles de dTMP necesarios para la biosíntesis del ADN. Por ende, revierte el efecto citotóxico provocado por los inhibidores de *TYMS*.

1.6.1.3. Expresión nuclear de la Timidilato Sintetasa

La función de la Timidilato Sintasa es la síntesis de timidinas. Su localización normal es el citoplasma celular.

La presencia de TS en el núcleo celular tiene un interés particular a la luz de las recientes investigaciones, donde se ha demostrado que la proteína TS y el ARNm de *p53* forman un complejo biológicamente activo y se especula que este complejo podría estar localizado en el núcleo, más concretamente en el nucleolo (Chu et al., 1999). Existen antecedentes de que la expresión proteica de *p53* se puede usar para complementar a la de *TYMS* en la predicción de respuesta a terapia basada en 5-FU (Lenz et al., 1999; Paradiso et al., 2000).

1.6.2. Ruta catabólica del 5-FU: DIHIDROPIRIMIDINA DESHIDROGENASA (DPYD)

Existe un equilibrio entre la ruta anabólica y la ruta catabólica del 5-Fluorouracilo. De manera que el 80-90% es catabolizado por DPD y expulsado de la célula, mientras que el resto es anabolizado por la Timidina Fosforilasa (TP).

Tras su administración, el 5-FU es catabolizado a 2-fluoro- β -alanina en el hígado en una ruta de tres pasos, en la que actúa en primer lugar la **Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD)**. DPD es la enzima inicial y limitante en el catabolismo del 5-FU, al reducir el doble enlace 5,6 del uracilo, y por tanto, también el del 5FU (Johnson et al., 1997).

DPD está codificada por un gen (*DPYD*) de 23 exones, localizado en el cromosoma 1p22. Se han descrito más de 40 mutaciones y polimorfismos, algunos de los cuales producen una reducción en la actividad de la enzima (Van Kuilenburg et al., 2005).

La citotoxicidad del 5-FU en la célula viene determinada por un desequilibrio entre la activación enzimática de éste y su eliminación por la ruta catabólica. *DPYD* es un factor esencial en la regulación del metabolismo del 5-FU puesto que mantiene el balance entre ambas rutas a través del catabolismo de más del 80% del 5-FU que entra en la célula (Diasio et al., 1999).

Más recientemente, algunos autores han señalado que la actividad de *DPYD* no sólo es determinante en cuanto a la farmacocinética del 5-FU y su toxicidad clínica, sino que también es un factor crítico en la biodisponibilidad del 5-FU, puesto que lo anaboliza a metabolitos activos dentro del tumor (Beck A et al., 1994, Nita ME., 1998). Por un lado, la actividad de *DPYD* es muy variable en tejidos normales y por otro, influye sobre la biodisponibilidad de 5FU, esta dualidad afecta a su toxicidad y actividad antitumoral (Grem et al., 1997). Puesto que la actividad de *DPYD* en tumores varía en las distintas líneas celulares y en las diferentes muestras clínicas de pacientes con cáncer, se ha comprobado que la medida de ARNm de *DPYD* en biopsias de tejido tumoral antes de administrar quimioterapia neoadyuvante con 5-FU predice la respuesta a la misma. Ishikawa y colaboradores determinaron que aquellos pacientes con la actividad *DPYD* disminuida en el tumor con respecto al tejido normal presentaban una mejor respuesta al tratamiento. De hecho, algunos tumores adquieren resistencia a terapias basadas en 5-FU mediante la inactivación de esta enzima (Uetake et al., 1999).

A pesar de ello, algunos autores indican que la concentración de ARNm de *DPYD* no se asocia con la respuesta a 5-FU. Esto se debe a que en tumores, la expresión de la proteína DPD es regulada a nivel postranscripcional (Tacechi et al., 1998). Por otro lado, se sabe que la regulación de la expresión de *DPYD* sigue un ritmo circadiano (Krugluger et al., 2007).

Mientras que el anabolismo del 5-FU es esencial para ejercer su actividad antitumoral, la vía catabólica del 5FU mediante el control indirecto de su disponibilidad para las reacciones anabólicas, es también un determinante crítico de su citotoxicidad y actividad antitumoral asociadas (Saltz et al., 2000). Por ende, la combinación apropiada de estos posibles determinantes de la resistencia a 5FU y de otros genes implicados en su ruta metabólica, podría resultar de gran utilidad en la predicción de la respuesta a este fármaco. En este sentido, existe un amplio repertorio de genes implicados directa o indirectamente en el metabolismo del 5FU, cuya expresión sería susceptible de ser analizada como posibles marcadores de respuesta o sensibilidad a este fármaco. Algunos de ellos ya han sido evaluados en estudios previos, como Timidina Fosforilasa (*TP*), Timidina quinasa (*TK*), Citidina desaminasa (*CDA*), *p53* o Metilen-tetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) (Grem et al., 2001, Jakob et al., 2004).

1.6.3 Ruta anabólica del 5-FU: TIMIDINA FOSFORILASA (TP)

La **Timidina Fosforilasa (TP)**, también denominada factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas, cataliza la interconversión de timina a timidina utilizando la desoxiribosa-1-fosfato (dR-1P) y fosfato inorgánico (Pi) como segundos sustratos. TP también cataliza la reacción de transferencia de un grupo desoxiribosilo de un nucleótido a otro. El principal papel de TP es el control de los niveles intracelulares de timidina, ya que concentraciones elevadas de este nucleótido son tóxicas para la célula y causan la acumulación de errores de replicación en el ADN. Además, se sabe que TP es un factor angiogénico que promueve el crecimiento tumoral, la progresión metastática y está relacionado con un fenotipo tumoral agresivo. Así, el incremento en los niveles de TP es un factor de mal pronóstico en cáncer colorrectal (Takebayashi, 1996), gástrico (Maeda., 1996) y de mama (Toi et al., 1995).

TP participa además en el anabolismo del 5-FU, en la interconversión a 5-fluoro-2-desoxiuridina (FdUrd) utilizando la dR-1P como sustrato. En uno de sus estudios, Metzger y col (1998) analizaron el valor predictivo de los niveles de ARNm de *TYMS* y *TP* en pacientes afectados por cáncer colorrectal no tratados previamente y sometidos a quimioterapia basada en 5-FU. Concluyeron que el incremento de los niveles de *TP* estaba ligado a una respuesta pobre al tratamiento. Esta relación inversa parece ser una consecuencia directa del papel angiogénico de *TP*. Lo que sugiere que el aumento de la expresión de esta enzima es un marcador de otros cambios genéticos asociados al desarrollo de un fenotipo tumoral más agresivo y maligno. Este fenotipo contribuye a la resistencia a agentes citotóxicos como el 5-FU a través de la pérdida del potencial apoptótico. Sin embargo, tal y como ocurre con *DPYD*, para poder predecir con una mayor precisión la sensibilidad de los tumores a la

quimioterapia basada en 5-FU es necesario tener en cuenta la expresión de *TYMS* y *DPYD* (Salonga., 2000).

Algunos autores han comprobado que los niveles de Timidina Fosforilasa suelen estar más elevados en el tejido tumoral que en el tejido normal adyacente. Cuando se administra 5-FU, el FdUMP es anabolizado por la TP presente en el tumor, que también puede transformar metabolitos derivados del 5-FU en 5-FU. Por tanto, la expresión de *TP* puede afectar a la sensibilidad a 5-FU; aunque estudios anteriores han determinado que su ADN puede transfectarse a células tumorales haciéndolas sensibles al tratamiento (Saltz et al., 2000).

1.6.4. RUTA DEL FOLATO

6.4.1 Metilentetrahidrofolato Deshidrogenasa (MTHFR)

El gen que codifica MTHFR está localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (locus 36.3). MTHFR es una enzima clave en el metabolismo del folato. Su papel principal es la provisión de grupos metilo mediante la reducción de 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metilentetrahidrofolato (5-MTHF). Este último sirve como sustrato para la remetilación de homocisteína a metionina y subsecuente producción de S-Adenosilmetionina (SAM). SAM es el donador universal de grupos metilo en humanos y es necesario para múltiples reacciones de metilación en la célula, entre ellas la metilación del ADN. La metilación de homocisteína es catalizada por la enzima Metionina Sintasa (MS), que requiere el cofactor vitamina B12 (Ulrich et al., 1999).

MTHFR también está ligada a la producción de dTMP vía Timidilato Sintasa y por tanto está ligada a la síntesis de purina, por lo que juega un importante papel en la provisión de nucleótidos esencial para la síntesis del ADN. Consecuentemente, cualquier defecto en el gen *MTHFR* tendría consecuencias tanto en la metilación como en la síntesis del ADN. Existen dos polimorfismos bastante comunes en el gen *MTHFR*. Uno de estos polimorfismos se localiza en el codón 677, que consiste en una transición de C a T, con la consecuente sustitución del aminoácido Alanina por Valina. El otro polimorfismo se encuentra en el codón 1298 y consiste en una permutación de A por G, con el consecuente cambio del aminoácido Alanina por Glutamato. Ambos polimorfismos producen un aumento en la termolabilidad de la enzima que disminuye su actividad al 35% (Fross P et al., 1995). Se ha comprobado que aquellos pacientes homocigotos 677TT muestran una actividad de la enzima MTHFR correspondiente a un 30% de la actividad que presentan los pacientes con genotipo *wild type* 677CC. Los pacientes heterocigotos presentan un 65% de actividad enzimática. Asimismo, el genotipo TT se asocia con niveles elevados de homocisteína y reducidos de folato en plasma (Narayanan S et al., 2004). Estas consecuencias sobre el metabolismo del folato derivan en que el riesgo de

padecer cáncer colorrectal disminuye con el genotipo variante TT (Ma et al., 1997, Chen et al., 1996). No obstante, el efecto del polimorfismo sobre el riesgo de padecer cáncer colorrectal está altamente influenciado por la dieta, factores ambientales, estado de SAM e ingesta de alcohol (Sharp et al., 2004).

Por otro lado, el defecto en la actividad de la enzima MTHFR por la presencia del polimorfismo 677T produce un incremento en los niveles de su sustrato 5,10-MTHF. Éste es el cofactor en la formación del complejo ternario a través del cual el 5-FU bloquea la actividad enzimática de TS. Por tanto, es de esperar que exista una correlación positiva entre los pacientes que poseen el alelo 677T y los que responden a la quimioterapia basada en 5-FU (Cohen et al., 2003).

Los polimorfismos en *TYMS* y *MTHFR* son determinantes de la concentración sérica de plasma, homocisteína y folato (Trinh et al., 2002, Lucock et al., 2000, Kealey et al., 2005). Cada vez se reconoce más la influencia de las concentraciones de folato y homocisteína antes del tratamiento con inhibidores de *TYMS* y antagonistas de folato en la respuesta al mismo (Bunn et al., 2001). Algunos estudios en ratones han indicado que los niveles de folato pueden predecir la eficacia citotóxica de 5-FU (van der Wilt et al., 2001). Además, los niveles de folato en suero antes del tratamiento con 5-FU pueden predecir los niveles de toxicidad durante el primer ciclo de tratamiento (Sharma et al., 2008).

1.6.4.2. Metionina Sintasa (MS) y Cistation-β-sintetasa (CBS)

Otros genes implicados en el metabolismo del folato, son la Metionina Sintasa (*MS*) y la Cistationina-β-sintetasa (*CBS*). *MS* se localiza en el cromosoma 1q43 y cataliza la remetilación de homocisteína a metionina. Por otro lado, *CBS* conjuga la homocisteína a serina (Paz et al., 2002). *MS* tiene un polimorfismo en el nucleótido 2756 A por G (Figura 11). La transición A-G en el nucleótido 2756 resulta en una sustitución de ácido aspártico por glicina que está en la zona del gen donde se unen las proteínas. *CBS* tiene también una variante polimórfica que consiste en una inserción de 68pb. La presencia de cualquiera de estos polimorfismos disminuye la actividad de la enzima correspondiente, produciendo un aumento de la homocisteína circulante e hipometilación del ADN (Leclerc, 1996; Paz et al., 2002).

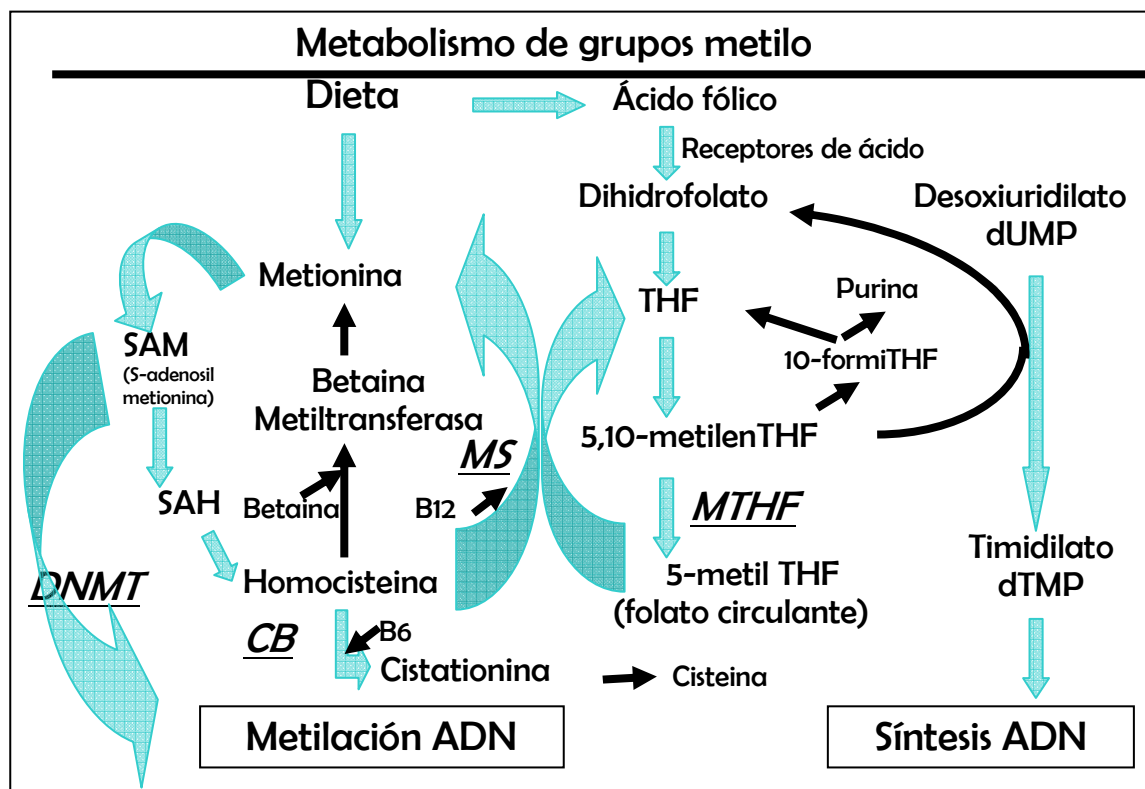


Figura 11: Ruta celular simplificada del metabolismo de grupos metilo. Se presentan las enzimas clave en la ruta metabólica del grupo metilo: *DNMT*, *TYMS*, *CBS*, *MS* y *MTHFR*. **THF:** tetrahidrofolato (Paz et al., 2002).

1.6.5. Otros mecanismos de resistencia al 5-Fluorouracilo

1.6.5.1. El factor de transcripción *E2F-1*

E2F-1 es un factor de transcripción que, en condiciones normales, se halla ligado a la proteína Retinoblastoma (pRb) en estado hipofosforilado, lo que impide su acción. Durante la progresión del ciclo celular (fase G1 a S), los complejos ciclinas/quinasas dependientes de ciclinas (*CDK*) hiperfosforilan la proteína pRb. En consecuencia, se relaja la unión de esta proteína al factor *E2F-1*. Este factor, una vez libre, activa la transcripción de genes que codifican para proteínas activas en la síntesis de ADN (TS entre ellas) (DeGregori J, 1995). Kashara y cols. (2000) analizaron los niveles de expresión de ARNm de *TYMS* y *E2F1* en tumores de colon de pacientes no tratados anteriormente con quimioterapia. Demostraron que la sobreexpresión de los niveles de *E2F-1* se correlacionaba con el incremento de los niveles de *TYMS* y peor respuesta al tratamiento con 5-FU. Además, otro estudio del mismo año mostraba que las metástasis pulmonares de CRC presentan una expresión de *TYMS* cuatro veces superior a las metástasis hepáticas. Esta expresión reveló una clara correspondencia con los niveles de *E2F-1* (Banerjee D et al., 2000) y una peor respuesta al

tratamiento. Posteriormente, realizaron la *Hibridación Genómica Comparativa* (CGH) y análisis por PCR del ADN de las metástasis de pulmón e hígado. Vieron que, frecuentemente, presentaban ganancias en la región cromosómica 20q y tenían un incremento en el número de copias del gen *E2F-1*. En base a estos resultados, *Iwamoto* y colaboradores postularon que *TYMS* podría estar regulada transcripcionalmente por *E2F1* y por eso se veía aumentada su expresión en las muestras tumorales.

Aparte de la síntesis de ADN, *E2F1* modula diversas funciones celulares tales como mitosis y apoptosis, también puede actuar como oncogén (Johnston et al, 1994) o como gen supresor de tumores (Fueyo J et al, 1998). Se han realizado estudios clínicos previos en los que se determinó que la sobreexpresión del gen *E2F1* favorecía el crecimiento tumoral en cáncer de pulmón, mama y tiroides (Gorgoulis VG et al, 2002), mientras que en tumores de colon y vejiga tenía el efecto opuesto (Rabbani F et al, 1999).

1.6.5.2. Gen supresor tumoral p53

p53 es un gen supresor de tumores que juega un papel principal en el mantenimiento de la integridad del genoma y regula la progresión del ciclo celular (Levine et al., 1993). La expresión de *p53* se induce, tanto en células malignas como en células normales, por numerosos estímulos como la radiación ionizante, UV, fenómenos de hipoxia, privación de factores de crecimiento y el daño inducido en el ADN por determinados agentes antineoplásicos (Figura 12). Las principales funciones fisiológicas de *p53* son:

- la regulación del ciclo celular en los puntos de transición G1/S y G2/M (a través de la inducción de la síntesis de proteínas inhibidoras de los complejos ciclina/quinasas dependientes de ciclinas)
- la activación de procesos de reparación del ADN y la señalización de procesos de apoptosis en los casos en que el daño genotóxico inducido no pueda ser reparado.

Respecto al papel que desempeña *p53* en la respuesta a quimioterapia es aún hoy controvertido. En algunos casos, la inactivación de *p53* resulta en un incremento en la resistencia, mientras que en otros, se ha correlacionado con una mayor sensibilidad a las drogas. Los estudios preclínicos sugieren que esta respuesta a los citotóxicos depende tanto del contexto celular como del agente antineoplásico utilizado. Si la principal respuesta por parte de la célula a los efectos genotóxicos es el bloqueo de la replicación y la activación de mecanismos de reparación, *p53* actuaría deteniendo el ciclo celular, favoreciendo la reparación del ADN en vez de los procesos de apoptosis y afectando potencialmente a la resistencia a los diferentes fármacos utilizados. En otros casos, sin embargo, el papel principal

de esta proteína es la inducción de muerte por apoptosis, por lo que las alteraciones de *p53* incrementan la sensibilidad a los fármacos.

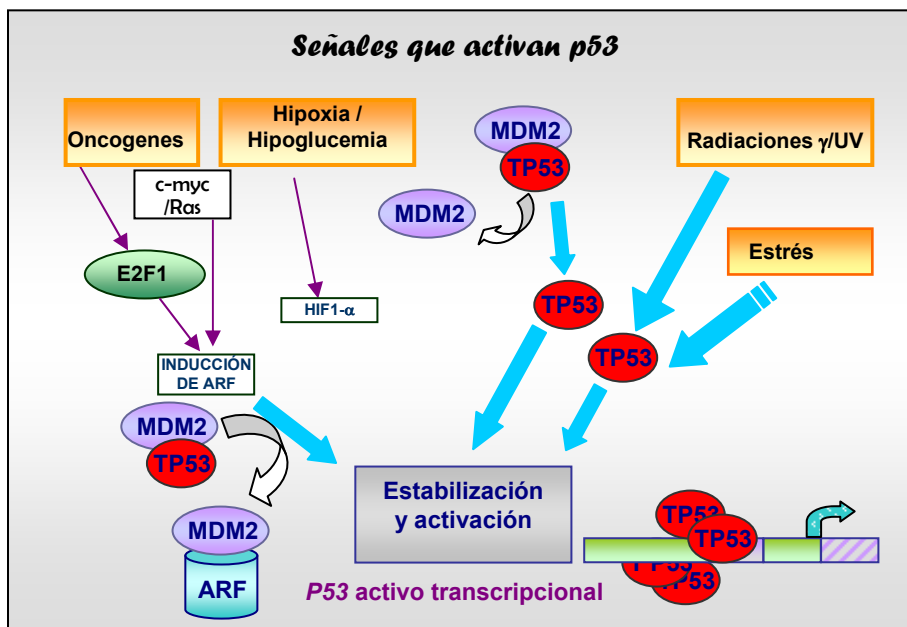


Figura 12: Señales de activación del gen supresor de tumores *p53* (esquema simplificado). ARF: *p14^{ARF}* (gen supresor de tumores). MDM2: Inhibidor de *p53* por unión a su dominio trans-activado.

Además de los mecanismos bioquímicos descritos con anterioridad, el 5-FU ejerce su acción citotóxica en parte a través de la inducción de apoptosis: la apoptosis debida a una privación de timidina o a la incorporación del 5-FU en el ARN, son procesos dependientes de *p53*. En particular, la apoptosis *in vitro* inducida por el 5-FU, requiere de la expresión de *p53* (Yang B, 1996). En cáncer colorrectal, un tipo de tumor que responde muy poco al tratamiento quimioterapéutico, las mutaciones de *p53* son eventos bastante comunes y pueden determinar la respuesta clínica de los tumores en cada paciente.

En un estudio publicado por Lee y cols. (1997) se sugiere que la proteína TP53 *wild-type* podría actuar modulando directamente la expresión de *TYMS*. Según estos autores, *p53* secuestraría algunos de los factores de transcripción que regulan positivamente la actividad del promotor del gen de *TYMS*. La pérdida de funcionalidad de *p53* provoca un incremento en los niveles de *TYMS*, contribuyendo así a la resistencia a 5-FU.

Por otro lado, TS es una proteína con capacidad de unión a ARN, y parece ser que, al igual que se une a su propio ARNm autorregulando su propia síntesis, también se une al ARNm de *p53* inhibiendo su traducción. Esto conlleva una ausencia de proteína TP53 que no se ve reflejada en los niveles de ARNm (Ju J et al., 1999).

1.6.5.3 Ganancias y/o pérdidas alélicas; *allelic imbalances*

Las deleciones o pérdidas de heterocigosidad (LOH) en el brazo largo del cromosoma 18 son un evento común en el cáncer colorrectal. En el 70% de los tumores, 50% de adenomas avanzados y en todas las metástasis hepáticas este fragmento cromosómico se halla mutado (Vogelstein, 1988). Su inactivación se asocia a tumores más agresivos y se han relacionado con una peor supervivencia en pacientes en estadio B y C de Dukes. Además, en el cromosoma 18 se sitúa el locus de la Timidilato Sintasa.

Recientemente se han asociado las ganancias en la región cromosómica 8p con una mayor supervivencia en cáncer colorrectal, aunque aún no se ha identificado el gen supresor tumoral responsable. Uno de los genes que se localizan en esta zona es el oncogén c-myc que se halla sobreexpresado en el 6% de los tumores de colon y que se correlaciona con un mejor pronóstico de la enfermedad (Mcleod HL, 1999).

1.7. EL OXALIPLATINO

Desde la introducción del cisplatino en los regímenes de quimioterapia, se han llevado a cabo numerosos intentos por sintetizar nuevos derivados del platino con mayor efectividad. De la sustitución de los radicales amino del cisplatino por radicales 1,2-diaminociclohexanos, se genera una nueva familia de compuestos que presenta un mecanismo de actividad diferente a otros agentes platinados, tal y como se demuestra en los estudios realizados en paneles de líneas celulares en el Instituto del Cáncer Americano (NCI: *National Cancer Institute*) (Rixe O et al., 1996). De entre estos compuestos, destaca el oxaliplatino ([trans[1R,2R]-1,2-ciclohexanodiamina-N,N'] oxalato-(2-)-O,O'-platino) (Figura 13).

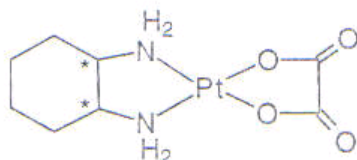


Figura 13. Estructura molecular del oxaliplatino

El Oxaliplatino es un compuesto de tercera generación que fue aprobado por la FDA para su uso en cáncer colorrectal metastático en 2002 (Raymond E. et al., 1998). A pesar de compartir el mecanismo de acción con el cisplatino, posee un espectro de citotoxicidad *in vitro* y una actividad antitumoral *in vivo* superiores a éste. Además, el Oxaliplatino es el primer agente platinado con probada actividad en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado.

También ha demostrado eficacia en otros tumores sólidos como el cáncer de ovario avanzado. Asimismo, los resultados preliminares indican su actividad en el tratamiento de tumores de mama, pulmón de célula no pequeña (NSCLC) y linfomas no-Hodgkins. Así pues, el Oxaliplatino muestra actividad en tumores con resistencia intrínseca o adquirida al cisplatino. Este hecho está relacionado con la diferente estructura de los enlaces o “aductos” que forma el oxaliplatino y que le permiten obviar ciertos mecanismos de resistencia a otros agentes platinados. Especialmente el que resulta de la reparación de los defectos en la replicación del ADN. En estudios preclínicos se ha demostrado que el Oxaliplatino interactúa sinérgicamente con otros agentes anticancerígenos, incluyendo el 5-FU (Taron M et al., 1999, Plasencia C et al., 2000).

1.7.1 MECANISMO DE ACCIÓN DEL OXALIPLATINO

Aunque el mecanismo preciso no es del todo claro, los agentes derivados del platino ejercen su citotoxicidad de forma similar a los agentes alquilantes. Producen enlaces intrahebra o entre las dos hebras del ADN (conocidos como *adducts*), sobre todo en islas CpG. Estos enlaces resultan en la formación de uniones covalentes entre el complejo activo platinado y determinadas bases de la secuencia del ADN, lo que lleva, en último término, a la apoptosis. De hecho, el grado de citotoxicidad que ejercen este tipo de compuestos, se correlaciona con la unión al ADN. Concretamente, las lesiones citotóxicas provocadas por el Oxaliplatino ocurren mayoritariamente por las uniones intracatenarias con dos guaninas adyacentes o próximas de forma similar a las que realiza el cisplatino. Otros aductos incluyen enlaces intracatenarios entre dos bases guanina-adenina adyacentes y enlaces entre guaninas de hebras opuestas del ADN. No obstante, estas uniones representan menos de un 5% del total de aductos generados. El Oxaliplatino forma protuberancias en el ADN más citotóxicas que las formadas por otros fármacos derivados del platino. Por tanto, es más efectivo en el bloqueo de la replicación (Raymond et al., 1998).

Los enlaces que el platino forma con el ADN causan la inhibición de la síntesis del mismo, interfieren en los procesos de transcripción e inhiben la reparación. Activan las vías de transducción de señales que desencadenan la apoptosis y finalmente la muerte celular. Este hecho, además, parece ser independiente de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula.

A pesar de las similitudes obvias en el tipo de lesiones que provocan, existen diferencias estructurales significativas tanto en el tipo como en la frecuencia de lesiones que ocasionan el Oxaliplatino y otros derivados del platino. A concentraciones equimolares, el Oxaliplatino genera un menor número de aductos ADN-platino pero presenta una toxicidad similar a los

otros compuestos (Wojnarowsky JM, 1998). Además, las uniones que se generan ocurren mucho más rápido (15 minutos en el caso del Oxaliplatino versus 12 horas para el cisplatino).

Los cruzamientos intrahebra provocan la transcripción de genes supresores de tumores, como *p53*, que llevan a la célula a apoptosis mediada por la activación de cascadas de quinasas. Estos depósitos de platino también favorecen la reparación del ADN por la enzima detoxificante Glutation-S-Transferasa π -1 (*GSTP1*). Además, *GSTP1* se une activamente al platino y contribuye a su eliminación del citosol (Figura 14). El daño en el ADN inducido por derivados del platino produce una parada transitoria del ciclo celular en fase S, por medio de la inhibición de algunas ciclinas. Este daño detiene de forma prolongada el ciclo celular en fase G2/M. Dicha parada del ciclo es necesaria para activar la ruta de reparación por escisión de nucleótidos (NER), donde actúan enzimas reparadoras como Xeroderma pigmentosum D (*XPD*). Y sólo cuando esta reparación es incompleta y el daño es mayor, la célula sufre apoptosis. Por consiguiente, las células tumorales que tienen *p53* mutado hacia una pérdida funcional son más sensibles a estos fármacos derivados del platino (Siddik et al., 2003).

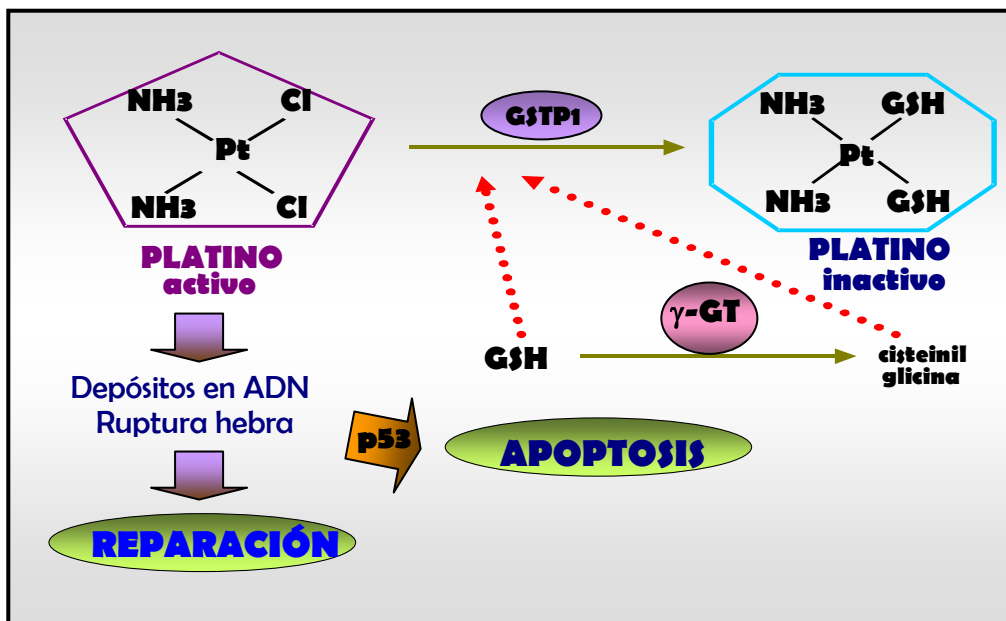


Figura 14: Esquematización de la ruta de acción del cisplatino. Produce daño en el ADN que puede ser reparado o llevar a la célula a apoptosis, aunque el cisplatino también puede ser inactivado por la enzima detoxificante *GSTP1*

1.7.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA

Existen dos mecanismos básicos de resistencia a derivados del platino. Uno trata de impedir o reducir la formación de lesiones citotóxicas en el ADN, y el otro minimiza su impacto, tratando de repararlas. El glutatión y otros componentes de su ruta metabólica también pueden tener un papel crítico determinando la sensibilidad celular a quimioterapia basada en derivados del platino. También puede proteger a las células de las especies reactivas de oxígeno. Se postula que la acción protectora del glutatión es resultado de la conjugación del péptido al agente quimioterapéutico citotóxico mediado por una familia de enzimas catalíticas conocidas como *GST* (*GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM*) (Hideaki et al., 1999).

1.7.2.1 *GSTP1*

GSTP1 pertenece a una superfamilia de enzimas detoxificantes, implicada principalmente en la eliminación de radicales libres de oxígeno, aunque también se une activamente al platino para expulsarlo de la célula (Figura 14) (Goto et al., 1999). Por tanto, la supresión o reducción de esta actividad detoxificante por polimorfismos genéticos podría asociarse con una mayor actividad citotóxica de los fármacos derivados del platino y los correspondientes posibles efectos sobre la supervivencia, o viceversa, en lo referente a la resistencia a estos esquemas de quimioterapia.

1.7.2.2 *Sistemas de reparación del ADN*

Estas protuberancias creadas en el ADN por los fármacos derivados del platino son reparadas principalmente por los sistemas de reparación de nucleótidos ***NER*** (*nucleotide excision repair*) (Figura 15). Por ello, mutaciones o polimorfismos en los genes implicados en estos sistemas pueden asociarse con una disminución en la capacidad de reparación y conllevar un aumento en el riesgo de cáncer, además de una sensibilidad mayor a la radiación ultravioleta o ionizante y a los agentes alquilantes. Se ha demostrado que ***ERCC1*** y ***XPD*** (*ERCC2*), y por otro lado ***XRCC1***, desempeñan papeles clave en la vía de reparación por escisión de nucleótidos ***NER*** y ***BER*** respectivamente (Lunn et al., 2000; Demoran et al., 2005).

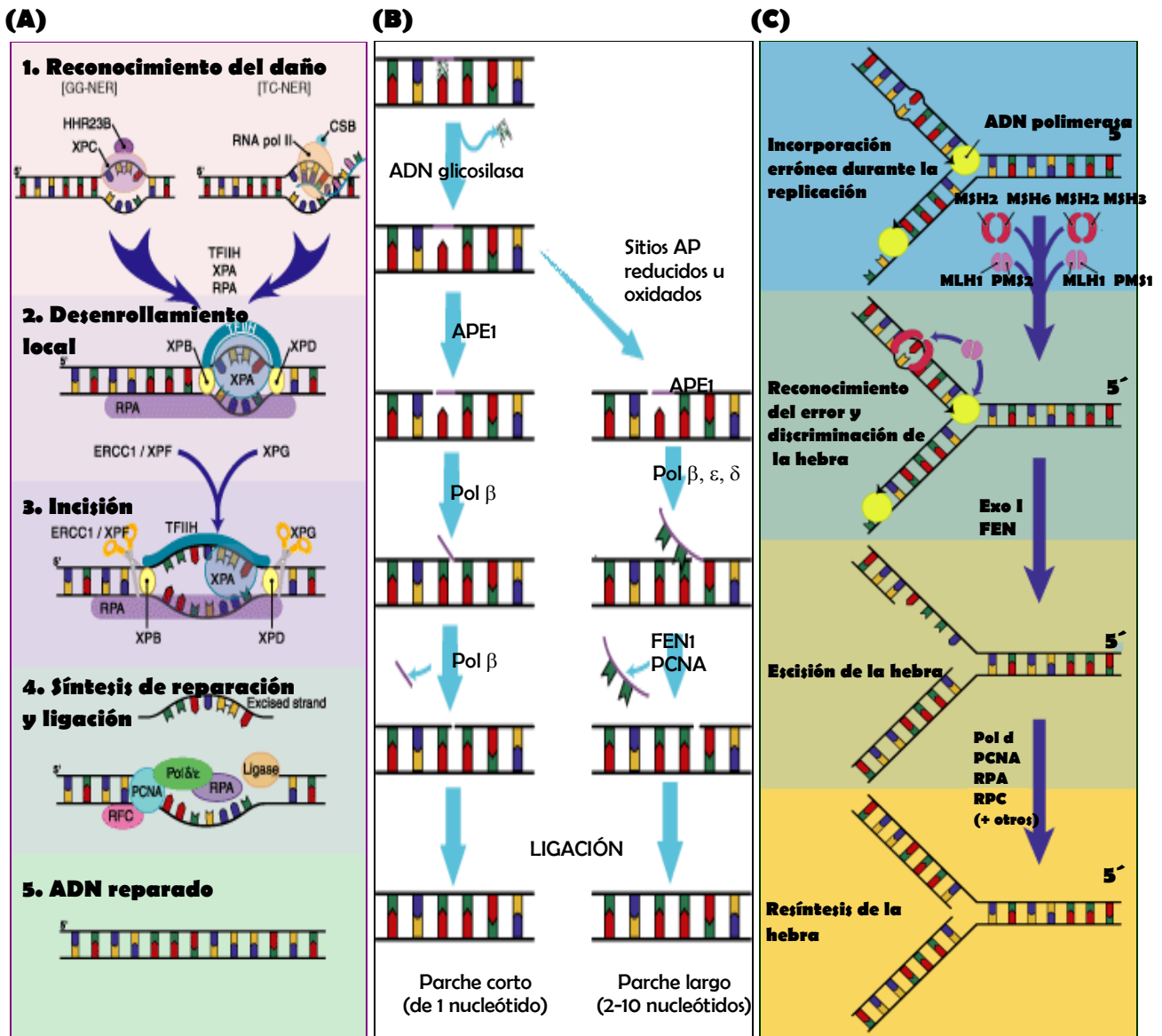


Figura 15: (A) Ruta de reparación del ADN por escisión de nucleótidos (NER). Se muestra un modelo simplificado de los pasos de la ruta NER. Hay dos formas distintas de NER: NER genómico global (GG-NER), que corrige el daño en zonas del genoma transcripcionalmente silenciadas, y NER acoplada a transcripción (TC-NER), que repara lesiones en la hebra transcripcionalmente activa del ADN. Las dos subrutinas son idénticas excepto en cuanto al mecanismo de reconocimiento de daño al ADN. La figura muestra un modelo simplificado de los pasos de NER: (1) Reconocimiento del daño al ADN, (2) Desenrollamiento local, (3) Incisión dual de la hebra de ADN, (4) Síntesis de ADN reparado y ligación de la hebra. (B) Ruta de reparación del ADN por escisión de bases. Se muestra un modelo general de parche corto (izquierda) y parche largo (derecha) de las rutas BER. La reparación de parche corto (80-90% del total de BER) reemplaza la lesión con un solo nucleótido. La reparación de parche largo reemplaza la lesión con aproximadamente 2-10 nucleótidos. (C) Sistema de reparación de apareamientos incorrectos (MMR: Mismatch repair). La figura muestra un modelo de MMR de ADN en mamíferos. MMR se inicia por reconocimiento del apareamiento incorrecto y discriminación de la hebra. Después la escisión de la hebra de nueva síntesis que contiene la base mal apareada o el *loop* de inserción/delección. Se realiza una resíntesis de la hebra para restaurar fielmente el ADN.

1.7.2.2.1. XPD (Xeroderma Pigmentosum D)/ERCC2

XPD es una helicasa 5´- 3´ que relaja el ADN durante la reparación por escisión de nucleótidos y transcripción. Esta enzima interviene en múltiples tareas celulares y algunas mutaciones raras en su secuencia génica dan lugar a diversas enfermedades genéticas como el xeroderma pigmentosum, una enfermedad autosómica recesiva consecuencia de un defecto en la vía de reparación NER de ADN dañado por UV. Las personas portadoras de esta enfermedad tienen un riesgo de cáncer de piel mil veces superior al normal.

Los polimorfismos de *XPD* pueden actuar como factores de susceptibilidad genética. Como estudio preliminar de funcionalidad, se analizó la asociación de dos polimorfismos localizados en los codones 199 (Ile/Met) y 751 (Lys/Gln) con la capacidad de reparar roturas en las cromátidas y el resultado fue una reparación subóptima en aquellas células portadoras de alelos mutados (Lunn et al., 2000).

1.7.2.2.2. XRCC1 (Nucleotide Excision Repair Cross Complementing)

XRCC1 es una proteína fundamental en la ruta de reparación por escisión de bases (BER), que repara la base dañada y las rupturas de una sola hebra en el ADN causadas por radiaciones ionizantes y agentes alquilantes. Se trata de una proteína componente del *Scaffold*, estructura proteica de sostén cromosómico, que está físicamente asociada con la ADN ligasa III en su extremo C-terminal (Shen et al., 2003). Algunos polimorfismos heredados en los genes de reparación del ADN pueden perjudicar su función e incrementar el riesgo de cáncer. Teniendo en cuenta que el producto génico de *XRCC1* recambia bases dañadas por oxidación, metilación, reducción o fragmentación, aquellas células con un gen *XRCC1* mutante serán más sensibles a radiación UV, radiación ionizante y agentes alquilantes. Los dos polimorfismos más importantes identificados hasta ahora llevan a una sustitución de aminoácidos en regiones del gen muy conservadas evolutivamente: en el codon 194 del exón 6, debido a un cambio de bases pirimidínicas C por T (Arg/Trp) y en el codón 399 del exón 10, debido a un cambio de bases púricas G por A (Arg/Gln).

Estos polimorfismos localizados en las regiones activas de la enzima XRCC1 en la interacción proteína-proteína pueden resultar en una falta de reconocimiento de las roturas de doble hebra, y una consecuente reducción de la eficiencia de reparación del ADN dañado. Esta ineficiencia de la enzima, evita la correcta señalización de muerte celular por apoptosis que, en última instancia, constituye el mecanismo de citotoxicidad de los agentes platinados. Esto conferiría un mayor riesgo de cáncer a aquellos pacientes portadores de estas mutaciones (Demokan et al., 2005). Por otro lado, los niveles reducidos de ARNm intratumoral de estos genes reparadores parecen estar relacionados con una mejora en la

supervivencia debido a una mayor sensibilidad del tumor al cisplatino y esquemas basados en derivados del mismo (Demokan et al., 2005, Lunn et al., 2005).

1.7.2.2.3. XRCC3

Otro gen reparador del daño provocado al ADN es **XRCC3** cuyo producto es una proteína de la familia de Rad-51, que participa en la reparación por recombinación homóloga de rupturas de ADN de doble hebra y cruzamientos para mantener la estabilidad genómica. El codón 241 de este gen presenta una variante genotípica en el exón 7 (T por C) que conlleva una sustitución del aminoácido Thr por Met. Este es un cambio no conservado que no reside en ningún dominio funcional conocido de la proteína. A pesar de ello, algunos autores hipotetizan que podría tener un efecto protector contra algunos tipos de cáncer (Shen et al., 2003).

En definitiva, la sensibilidad de las células cancerosas a los esquemas de quimioterapia basados en 5FU/oxaliplatino está influenciada por diversos parámetros moleculares (Kawakami et al., 2001, Salonga et al., 2000). El análisis global de las alteraciones moleculares en las células cancerosas resistentes a 5FU resultaría de gran utilidad para desentrañar los complejos mecanismos de quimiorresistencia a 5FU. La tecnología de microarrays desarrollada en los últimos años, ha permitido el análisis de los perfiles de expresión genómicos en células y tejidos de interés, para comprender en profundidad sucesos patológicos complejos. La combinación de estas tecnologías con los métodos moleculares tradicionales, y la unificación con los parámetros histopatológicos y los datos de sensibilidad y respuesta a 5FU, permitirá caracterizar funcionalmente genes relacionados con la resistencia a fármacos anticancerígenos, e identificar nuevas dianas moleculares para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos.

II. OBJETIVOS

1. El objetivo principal consistía en desarrollar un algoritmo diagnóstico que pueda implementarse en clínica para optimizar el tratamiento individualizado con 5-FU en pacientes de cáncer colorrectal. Con este fin, se plantearon diversos hitos para ir desvelando los mecanismos de sensibilidad y resistencia a 5-FU en aras de definir el algoritmo molecular predictivo:
2. Estudiar los mecanismos de resistencia en líneas celulares tratadas con diferentes esquemas de 5-FU/oxaliplatino y comprobar si pueden ser trasladados a pacientes con tumores de colon.
3. Búsqueda de potenciales marcadores de sensibilidad y resistencia a 5-Fluorouracilo entre los polimorfismos de los genes de la ruta metabólica del 5-FU (*TYMS*, *TP* y *DPYD*), así como genes del metabolismo de grupos metilo (*MTHFR*, *CBS* y *MS*), genes reparadores del ADN (*XRCC1*, *XRCC3* y *XPB*) y genes detoxificantes (*GSTP1*)
4. Asociación entre el perfil de metilación aberrante del ADN en líneas celulares y tumores de colon con el tipo de respuesta y sensibilidad a 5-Fluorouracilo/oxaliplatino. Establecer posibles mecanismos epigenéticos de resistencia a terapia basada en 5-FU.
5. Análisis exhaustivo de tejidos tumorales a nivel genético y epigenético en genes o vías metabólicas asociadas al mecanismo de acción del 5-FU con el fin de identificar posibles marcadores de respuesta a quimioterapia.
6. Determinar si existe alguna asociación entre el perfil genético y epigenético caracterizado para cada tumor con sus características moleculares y clinicopatológicas, tales como lateralidad, estadio, expresión de ARNm, respuesta y citotoxicidad al tratamiento con 5-FU.
7. Comparar, a nivel genético y epigenético, tejidos tumorales y línea germinal correspondiente (sangre periférica) con el fin de determinar marcadores de respuesta a 5-FU más accesibles que el tumor.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. LÍNEAS CELULARES

Con el fin de evaluar el potencial citotóxico y la respuesta a los agentes farmacológicos objeto de este estudio, se utilizaron líneas celulares establecidas a partir de tumores humanos. Las 16 líneas celulares utilizadas fueron adquiridas del repertorio comercial ATCC (www.atcc.org) (tabla 1). Estas líneas representan cinco tipos tumorales diferentes:

TIPO TUMORAL	LÍNEA CELULAR	Nº ATCC
MAMA	MCF-7	HTB-22
	Hs578T	HTB-126
	HCC1937	CRL-2336
COLON	SW-620	CCL-227
	SW-480	CCL-228
	SW-48	CCL-231
	HCT-116	CCL-247
	DLD-1	CCL-221
	CACO-2	HTB-37
	LoVo	CCL-229
	HT-29	HTB-38
PULMÓN	A549	CCL-185
	H441	HTB-174
CERVIX	HELA	CCL-227
	SW756	CRL-10302
LEUCEMIA	HL-60	CCL-240

Tabla 1: Se muestran las líneas celulares utilizadas para los ensayos *in vitro*. Se indican los tipos de tejido a los que pertenecen y el número de referencia del ATCC (*American Type Culture Collection*).

Todas las líneas celulares son adherentes excepto HL-60 y todas ellas se cultivaron en Medio Mínimo Esencial Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% suero fetal bovino (inactivado a 56°C durante 45 min) y 1% penicilina/estreptomicina a 37°C y 5% de CO₂. Las extracciones de ADN y ARN se realizaron mediante el reactivo comercial Tri-Reagent® de *Sigma*® siguiendo su protocolo establecido.

3.1.1. Curvas de crecimiento de líneas celulares

Se plaquearon células de cada línea celular a una densidad de 10^5 células por pocillo en placas p6 por duplicado. Se tripsinizaron y se tiñeron con Azul Tripán que es un tinte de viabilidad capaz de diferenciar entre células vivas (no teñidas) y muertas (teñidas) para realizar un recuento al cabo de 24, 48 y 72 horas de cultivo (Figura 16).

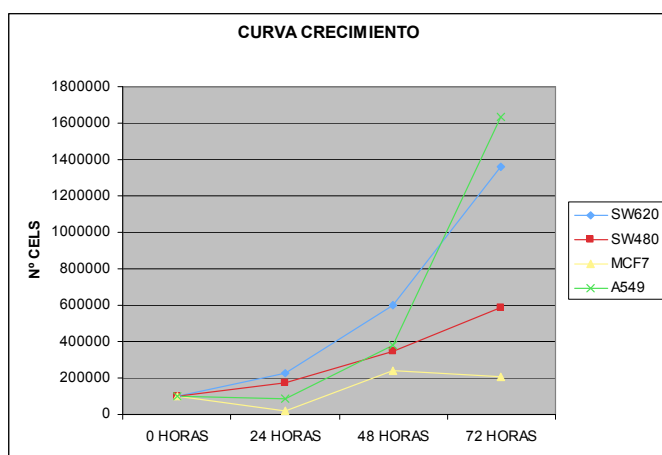


Figura 16: Curva de crecimiento de las líneas celulares SW620, SW480, MCF7 y A549

3.1.2. Tratamiento de las líneas celulares con 5-Fluorouracilo/Oxaliplatino

El **5-Fluorouracilo** utilizado para los tratamientos de las líneas celulares se adquirió a la casa *Sigma*[®]. Se disolvió en NH_4OH a una concentración stock de 5mg/ml y se conservó a temperatura ambiente en oscuridad. Las diluciones posteriores se realizaron en medio de cultivo hasta alcanzar la dosis correspondiente antes de su utilización.

* La concentración de NH_4OH en el medio de cultivo, inferior a 0.01% demostró no ser tóxica.

El **oxaliplatino** utilizado para los tratamientos de las líneas celulares también se adquirió a la casa *Sigma*[®]. Se disolvió en PBS 1x a una concentración de 1mg/ml y se conservó en frasco esmerilado a 4°C. Las diluciones posteriores se realizaron en medio de cultivo hasta alcanzar la dosis correspondiente antes de su utilización.

3.1.2.1. Análisis de la CITOTOXICIDAD/VIABILIDAD de las células tratadas con 5-Fluorouracilo y Oxaliplatino

Los análisis de citotoxicidad y viabilidad se llevaron a cabo mediante diferentes técnicas.

3.1.2.1.1. Análisis de citotoxicidad por MTT

Ensayo colorimétrico basado en la capacidad de las células viables para metabolizar la sal de tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide) (Sigma-Aldrich®) de color amarillo (MTT) dando lugar a la sal de formazán de color violeta tras tres horas de incubación a 37°C. Esta sal se solubiliza con Isopropanol, resultando una solución violeta cuantificable mediante absorbancia a 570nm en un lector convencional de ELISA. Como lectura de referencia se utiliza una longitud de 695nm. La densidad óptica DO, es proporcional al número de células viables. Se plaquearon células de todas las líneas a estudiar en placas de 96 pocillos con una densidad de 2500 células por pocillo. Tras 24 horas en cultivo, se aspiró el medio normal y se añadió medio con diferentes concentraciones de 5-Fluorouracilo (5 µM, 50 µM y 500 µM), oxaliplatino (5 µM, 50 µM y 500 µM) y dos combinaciones distintas de ambos (50 µM de 5-FU + 30 µM de Oxaliplatino y 50 µM de 5-FU + 3 µM de Oxaliplatino). El tratamiento con la droga se realizó durante 72 horas renovándola cada 24 horas desde el inicio del tratamiento.

Las lecturas de citotoxicidad fueron tomadas a las 24h, 48h y 72 horas de tratamiento por duplicado cada vez. Cada experimento se repitió un mínimo de tres veces de forma independiente. En cada experimento, se calcula la fracción de supervivencia como el cociente de DO entre las células tratadas y el DO de las células control no tratadas, tanto en el caso de la administración individual como en la combinación de fármacos. Los datos obtenidos se analizan por el método del efecto medio (median-effect lines). Este método consiste en representar el $\log_{10} [(1/f)-1]$ frente al \log_{10} (dosis droga). Se calcula la recta de regresión por el método de los mínimos cuadrados (en todos los casos se aceptaron rectas que presentaban un coeficiente r^2 superior a 0.95). A partir de las líneas resultantes denominadas median effect lines, se calcula la pendiente m y la dosis IC50 (dosis que inhibe el 50% del crecimiento celular, es decir, la mitad de la concentración inhibitoria total de la droga). Con estos parámetros evaluamos las concentraciones individuales de las drogas (utilizadas como agentes únicos) necesarias para inhibir una fracción celular determinada en un rango del 10% al 90% según la ecuación:

$$\text{Dosis}_f = \text{Dosis}_{\text{IC50}} (1/f-1)^{1/m}$$

3.1.2.1.2. Ensayos de inhibición de crecimiento (IG50)

Se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de líneas celulares de colon tratadas con 5-FU a diferentes dosis para determinar el índice de crecimiento al 50% (IG50).

Se siembran uniformemente las células en placas de 12 pocillos por triplicado. Después de 24 horas, se retira el medio. Se reemplaza por 2ml de medio fresco con el tratamiento.

Después las células se cuentan en un hemocitómetro y se calcula el porcentaje de crecimiento respecto a las células que se sembraron. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y no hubo discrepancias. De este modo se determinó, por extrapolación, el índice de crecimiento al 50% que es el IG50.

3.1.2.1.3. Ensayos clonogénicos

Para determinar la resistencia de las líneas celulares al tratamiento con 5-Fluorouracilo/oxaliplatino *in vitro*, se llevaron a cabo ensayos de formación de colonias.

Se pusieron en cultivo las líneas celulares de colon y se trataron con 5, 50 y 500 μM de 5-FU durante 9 horas. Luego se aspiró el medio y se tripsinizaron las células, se contaron y se replaquearon por triplicado en placas de 6 pocillos a una densidad de 500 células por pocillo. La formación de colonias se monitorizó durante los días siguientes. Cuando las colonias tenían el tamaño suficiente para visualizarlas claramente, se tiñeron las células con 1% de cristal violeta durante 30 min, se lavaron con agua destilada, se dejaron secar al aire y se escanearon. Los ensayos se realizaron dos veces por triplicado y no hubo discrepancias.

3.1.2.1.4. Análisis de citotoxicidad y apoptosis mediante CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células en cultivo fueron plaqueadas a una densidad de 5×10^5 células por pocillo en placas P6. Tras 24 horas en cultivo, se aspiró el medio normal y se añadió medio con diferentes concentraciones de 5-Fluorouracilo (5 μM , 50 μM y 500 μM), oxaliplatino (5 μM , 50 μM y 500 μM) y las dos combinaciones de ambos (50 μM de 5-FU + 30 μM de Oxaliplatino y 50 μM de 5-FU + 3 μM de Oxaliplatino). El tratamiento con la droga se realizó durante 72 horas renovándola cada 24 horas desde el inicio del tratamiento sin aspirar el medio anterior para no eliminar las células apoptóticas. Para los controles sin tratar también se renovó el medio cada 24 horas.

Se tomaron datos de citotoxicidad y respuesta a los fármacos a las 24, 48 y 72 horas desde el inicio del tratamiento.

Los experimentos fueron realizados por cuadruplicado de forma independiente tanto para los distintos tratamientos como para los controles sin tratar.

Con el fin de estudiar la citotoxicidad y apoptosis causada por la droga, las células tripsinizadas a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento, fueron lavadas con PBS y resuspendidas en *Binding Buffer* (Hepes 10 mM, NaCl 140 mM y CaCl_2 2.5 mM, pH 7.4) y divididas en dos mitades: una de ellas se incubada con Anexina-APC (dilución 1:80) durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y la otra se utilizó como control negativo sin anexina

para establecer los márgenes de viabilidad. Después ambas fueron teñidas con Yoduro de propidio (IP) de Sigma-Aldrich® a una concentración final de 0.001% en un volumen mínimo de 500 µl.

Este método permite detectar el proceso de translocación de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana celular que se produce durante los estadios preliminares de la apoptosis. Consiste en una doble tinción Anexina V (Invitrogen®/Yoduro de Propidio. La Anexina V es un anticuerpo específico de la fosfatidilserina que lleva conjugada una molécula de fluoresceína que emite en la zona verde del espectro y que al unirse a la membrana celular permite cuantificar el porcentaje de células apoptóticas presentes en un cultivo. El Yoduro de Propidio (emisión en la zona roja del espectro) es un colorante vital que entra únicamente en células muertas y que nos permite calcular el porcentaje de células necróticas presentes en el cultivo.

Todas las muestras se analizaron por citometría de flujo con el citómetro FACS-Canto II de Becton-Dickinson® con el software FACSDIVA® de la misma casa comercial. Las distintas poblaciones celulares se centran atendiendo al tamaño y complejidad celular (FSC/SSC). La fluorescencia se mide mediante los fotomultiplicadores FL3 y FL5 para el IP y la Anexina-APC respectivamente.

3.1.2.1. Análisis de apoptosis por TUNEL

El desarrollo de la técnica de TUNEL (dUTP-final TdT-mediada) posibilita evaluar la fragmentación nuclear *in situ*. Esta técnica se basa en la incorporación de un oligonucleótido marcado con fluorescencia, permitiendo la localización y cuantificación de núcleos fragmentados.

Las células fueron plaqueadas en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^6 células por pocillo. Tras 24 horas en cultivo, se procedió de la misma manera que para los ensayos anteriores, aspirando el medio normal y añadiendo medio recién preparado con la droga a las diferentes concentraciones anteriormente citadas (5µM, 50µM y 500 µM) de 5-FU u oxaliplatino y las dos combinaciones de ambos: 50µM de 5FU+30µM de oxaliplatino y 50µM de 5FU+3µM de oxaliplatino). Los tratamientos se fueron renovando cada 24 horas durante 72 horas sin aspirar el medio para no eliminar las células apoptóticas. Transcurrido este periodo de tiempo, se cogió el medio que contenía las células apoptóticas y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Se procedió a levantar las células adheridas con tripsina y la mezcla de ambas fracciones disueltas en PBS 1x fue colocada en un porta mediante *citospin* (centrífuga para traspasar células en suspensión a un portaobjetos cuando se quieren realizar tinciones) centrifugando a 400 g durante 3 minutos poniendo 200 µl de muestra en cada porta. Tras diez minutos de secado a temperatura ambiente, las muestras se fijaron con formaldehído al 4% en PBS 1X durante una hora. Posteriormente se permeabilizaron con

Tritón X-100 0.1% en Citrato Sódico en PBS 1X. Uno de los portas se trató con DNAsa I (1mg/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente para utilizarlo como control positivo.

Los ensayos de TUNEL se realizaron con el kit *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*[®] de Roche. Las preparaciones se montaron con medio Vectashield-DAPI DE Laboratorios VECTOR[®] y posteriormente se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon. Se contaron las células positivas y se realizó un ratio con respecto al control sin tratar.

3.1.3. Patrón del ciclo celular de las células tratadas con 5-Fluorouracilo y Oxaliplatino

El patrón de ciclo celular de las líneas celulares tratadas con 5-FU, oxaliplatino o combinación de ambos se analizó mediante citometría de flujo.

La técnica utilizada se basa en la tinción del ADN con Yoduro de Propidio (IP) de Sigma[®] para comparar la cantidad de ADN en cada célula y determinar así en qué fase del ciclo celular se encuentra.

Se sembraron todas las líneas celulares 5×10^5 células por pocillo en placas P6. Tras 24 horas en cultivo, se aspiró el medio normal y se añadió medio con diferentes concentraciones de 5-Fluorouracilo (5 μ M, 50 μ M y 500 μ M), oxaliplatino (5 μ M, 50 μ M y 500 μ M) y las dos combinaciones de ambos (50 μ M de 5-FU + 30 μ M de Oxaliplatino y 50 μ M de 5-FU + 3 μ M de Oxaliplatino). El tratamiento con la droga se realizó durante 72 horas renovándola cada 24 horas desde el inicio del tratamiento y añadiendo medio limpio en el caso de los controles sin tratar. Las muestras fueron tripsinizadas a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento y teñidas siguiendo el protocolo:

- Se lavan las células una vez con PBS 1x.
- Se fijan con Etanol al 70% frío resuspendiendo con la pipeta durante un minuto.
- Se lavan dos veces con PBS 1X centrifugando a 4000 rpm durante 8 minutos cada vez.
- Se resuspenden en 500 μ l de PBS1x con RNAsa (0.1mg/ml) y Yoduro de propidio (0.03%) y se incuban durante 30 minutos a 37°C.

Posteriormente se analizaron con el citómetro FACS-Canto II de Becton-Dickinson[®]. La adquisición se realizó con el software FacsDIVA[®] y el análisis con el programa ModFit[®] de la misma casa comercial.

Se centra la población celular por tamaño y complejidad (FSC/SSC) y se adquieren por el canal de fluorescencia roja del Yoduro de Propidio, FL2-A, discriminando los dobletes con la actividad DDM (FL2-A/FL2-W), que compara la altura y anchura de pico. Los picos de fluorescencia de la fase G1 se centran sobre las 200 unidades arbitrarias de fluorescencia.

Para todas las muestras se analizan un mínimo de 10.000 células por tubo. Los experimentos se repitieron por triplicado.

3.1.4. Análisis de la expresión de ARNm en células tratadas con 5-FU/oxaliplatino por RT-PCR cuantitativa

Esta técnica fue utilizada para cuantificar la expresión de ARNm de los genes *TYMS*, *TP*, *DPYD*, *MTHFR*, *P53*, *E2F1* y *RFC* a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento y 72 horas después del tratamiento. Como gen constitutivo se utilizó *GAPDH*.

3.1.4.1. Extracción de ARN

Se extrajo ARN de las diferentes líneas celulares tratadas a diferentes tiempos y a las concentraciones anteriormente citadas de 5-FU, oxaliplatino y combinación de ambos mediante el reactivo comercial Tri-Reagent® de Sigma y siguiendo su protocolo establecido.

3.1.4.2. RT

A partir de 1 µg del ARN extraído se realizó una retrotranscripción con el kit Reverse Transcription System de Promega en un volumen final de 20 µl.

3.1.4.3. qPCR

La cantidad de ADNc utilizado en la reacción de PCR cuantitativa fue de 2µl procedentes de la dilución 1/10 del volumen resultante en la RT. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un volumen final de 10µl. Cada reacción contenía 200nM de cada cebador específicos del transcrito a amplificar y 5 µl de Sybr Green® de Applied Biosystems®.

GEN	CEBADOR F (5' - 3')	CEBADOR R (5' - 3')
<i>TYMS</i>	GAATCACATCGAGCCACTGAAA	CAGCCCAACCCCTAAAGACTGA
<i>TP</i>	TGGCTCAGTCGGACAGCAG	TCCGCTGATCATTGGCACCT
<i>DPYD</i>	AATGATTGAAGAGCTTTGAAGC	GTTCCCCGGATGATTCTGG
<i>MTHFR</i>	CTCTGGCAGGTGGTGAAGA	TCATGGAGCCTCCGTTTCTC
<i>P53</i>	TCAACAAGATGTTTGCCAACTG	ATGTGCTGTGACTGCTGTAGATG
<i>E2F1</i>	CCCAACTCCCTCTACCCTTGA	TCTGTCTCCCTCCCTCACTTTC
<i>RFC</i>	CCTCCTGGTGTCAGCAAGCT	CCCGAGAGTCACTGGTTCACA
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCCGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC

Tabla 2: Se muestran, en dirección 5' - 3', las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar por qPCR los genes *TYMS*, *TP*, *DPYD*, *MTHFR*, *P53*, *E2F1*, *RFC* y *GAPDH*, este último como control interno o gen *housekeeping*.

Se utilizó el gen constitutivo *GAPDH* como control interno de la reacción y para asegurar la calidad del ADNc. Las condiciones de la reacción de qPCR fueron 50°C durante 2min, 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C 1 minuto. Tras la reacción de PCR, se realizó una curva de disociación de 95°C durante 15 segundos seguida de 60°C durante 15 seg. Todas las reacciones se realizaron por duplicado en placas ópticas de 384 pocillos de Applied Biosystems en la PCR cuantitativa ABI PRISM 7900HT FAST de la misma casa.

La medida de la expresión génica por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión del gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno). Los resultados fueron analizados con el software SDS 2.3 por el método del $\Delta\Delta C_t$, en el que se comparan directamente los C_t s (CICLO UMBRAL) del gen testado y gen de referencia (ΔC_t) en cada muestra, y posteriormente se comparan los ΔC_t de la muestras experimental con respecto a la muestra control (sin tratamiento).

3.1.5. Cuantificación de ARNm

La cantidad de ARNm presente en cada muestra de células tratadas con las distintas concentraciones de 5-FU, oxaliplatino y combinación de ambas, se determinó mediante el análisis de los resultados de la PCR cuantitativa con el software Real Time PCR SDS 2.3 de Applied Biosystems®. Se utilizó el método de la comparación de C_T (ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra supera el umbral establecido). Para cada muestra problema, se calcula la cantidad relativa normalizando el C_T del gen a estudiar en la muestra con respecto al del gen housekeeping GAPDH de la misma muestra. Este método elimina la necesidad de curvas estándar.

Para comparar la expresión de cada gen a distintos tiempos de exposición y a diferentes concentraciones de cada droga, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis,

3.1.6. Análisis de los niveles proteicos en células tratadas con 5-FU/oxaliplatino

3.1.6.1. Inmunocitoquímica

La presencia y localización de la proteína TS fue evaluada por inmunocitoquímica en todas las líneas celulares y para los diferentes tratamientos.

Se plaquearon 5×10^3 células de cada línea en cada celdilla de un porta Chamber-Slide™ Lab-Tek II de Nunc® de cuatro cámaras. Algunas líneas que no se adherían a estos

portas se plaquearon a una densidad de 500×10^3 células por pocillo en placas de 6 pocillos donde previamente se habían colocado cubres de 12mm de diámetro tratados con gelatina durante 15 minutos. Las células crecieron sobre ellos y en el momento de realizar la inmunocitoquímica sólo fue necesario levantar los cubres y lavarlos con PBS 1x.

A las 24 horas de cultivo, en cada una de las celdillas se reemplazó el medio normal con medio que contenía 5-FU (5,50 o 500 μ M), oxaliplatino (5,50 o 500 μ M), una combinación de ambos (50 μ M 5-FU+30 μ M oxaliplatino ó 50 μ M 5-FU+3 μ M oxaliplatino) o medio sin tratamiento. Los medios se fueron renovando cada 24 horas durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, se aspiró el medio, se lavaron las células con PBS 1X y se fijaron en acetona durante 10 minutos. Luego se aclararon con PBS 1x y se incubaron con BSA 0.1% en PBS 1X a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se procedió a la incubación durante 2 horas a 37°C con el anticuerpo anti-Timidilato Sintasa 106-clone (Chemicon) en una dilución 1:50. Tras este periodo de incubación, se lavaron las muestras con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa 488-Goat anti mouse diluído 1:200 durante una hora a temperatura ambiente.

Tras lavar de nuevo, se desmontaron las celdillas y se montó la preparación con DAPI-Prolog. En el caso de los cubres, éstos se colocaron sobre un porta fijados con DAPI-Prolog. Se mantuvieron a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 horas y luego se analizaron por microscopía confocal (Leica).

3.1.6.2. Western Blot

Se analizaron los niveles proteicos nucleares y citoplasmáticos de los genes *TYMS* (anticuerpo 106-clone de Chemicon), *TP* (anticuerpo Abcam) y *p53* (anticuerpo Upstate) en las diferentes líneas celulares tratadas con 5, 50 y 500 μ M de 5FU u oxaliplatino y las dos combinaciones de ambos. También se extrajo proteína del control negativo cultivado en medio libre de fármaco.

- La extracción de fracciones proteicas subcelulares se llevó a cabo siguiendo el protocolo:

- Raspar cels en hielo en PBS / o tripsinizar
- Centrifugar 3000rpm 10´ 4°C. Descartar sobrenadante
- 200 ml tampón hipotónico. Incubar 2´ a 4°C
- Añadir 20ml (por cada 200ml de tampón) NP-40 (0.5% Cf)
- Centrifugar 3000rpm 10´ 4°C. El sobrenadante contiene fracción citosólica
- Añadir tampón hipotónico : tampón salino (1:1)
- Incubar 30´ 4°C (*Vortex* cada 10´)
- Centrifugar 15000rpm 30´ 4°C. El sobrenadante contiene fracción nuclear

Al cabo de 72 horas de tratamiento, para cada línea celular y cada dosis, se desnaturalizaron 30µg de proteína nuclear y 30µg de proteína citoplasmática y se realiza una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12.5%. Posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se llevó a cabo la inmunodetección con los diferentes anticuerpos específicos para cada proteína. El revelado se realizó con un anticuerpo secundario ligado a peroxidasa y exposición a película fotográfica.

3.1.7. Análisis del genotipo de los genes del metabolismo del 5-Fluorouracilo, genes reparadores y detoxificantes

El genotipado de las diferentes líneas celulares, se llevó a cabo del mismo modo que para las muestras de pacientes, como se menciona en el apartado 3.2 de materiales y métodos.

3.1.8. Análisis del estado de metilación de las islas CpG en líneas celulares

Se llevó a cabo del mismo modo que el estado de metilación de islas CpG en muestras procedentes de pacientes (ver apartado 4 de materiales y métodos).

3.1.8.1. MSP; (Methylation Specific PCR/PCR específica de metilación)

Los genes seleccionados para caracterizar el estado de metilación en líneas celulares fueron: *TYMS*, *TP*, *DPYD*, *MTHFR* (genes de la ruta del folato y del 5-fluorouracilo), *GSTP1* (detoxificante), *XPD*, *MGMT*, *hMLH1* (genes reparadores), *p14^{ARF}*, *P15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}*, *p73* (genes de ciclo celular), *MDR1* y *MRP3* (gen de resistencia a drogas). Las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los genes por MSP se muestran en la tabla 3. Las condiciones utilizadas para las PCRs en un volumen final de 25µl, fueron 2µl de ADN tratado con bisulfito, 1x buffer, 2.5mM de MgCl₂, 0.3mM de dNTPs, 0.3µM de cada oligonucleótido y 1 unidad de Taq "HoT Start". Desnaturalización 94º 7min seguido por 35 ciclos 94º 30 seg, annealing 30 seg, 72º 30 seg y extensión final 72º 7 min.

GEN	CEBADOR MS (F-metilado) (5'-3')	CEBADOR MAS (R-metilado) (5'-3')	CEBADOR US (F-no metilado) (5'-3')	CEBADOR UAS (R-no metilado) (5'-3')
TYMS	GCGCGGGTAATATATATA GTAGC	ACCACGACATCACTAAAAC GA	ATTGGTGTGGGTAATATATA TAGTAGTGA	AAAACCACAACATCAC
TP	GTGTTTTCGGGTTCGTAGT ATC	GCCTAACGAATCAATTATCC GC	GTGTTTTGGGTTTGTAGTA TTGG	CCACCTAACAAATCAAT
DPYD	TTTGTTTAGTAAGGATT CGGC	GTCTCTCACTCTCCGAAATA CGA	TTGTGTTTAGTAAGGATTG GTGG	CATCTCTCACTCTCCAA
MTHFR	ACGATAAAGGTACGGTTT TTAAC	GAATAACTCAAAACGCTCG AC	GATGATAAAGGTATGGTTT TAATGA	TCCCAAATAACTCAAAA
GSTP1	GGATTTTTTAGAAGAG CGGTC	TAATAACGAAAACACTACG ACGAC	GGGATTTTTTAGAAGAG TGGTT	CACTAATAACAAAA
XPD	ATCGTTTTATTCGAGAG TTAGTCGT	CTATACAACGAAATCGA CCCG	GTATTGTTTTATTTGAGA GTTAGTTGT	ACTATACAACAAAAT
MGMT	CGGATATGTTGGGATA GTTCCG	GCCTACAAAACCACTCG AAAC	TGGATATGTTGGGATAG TTTGT	ACCTACAAAACCACT
hMLH1	GAATTTGAGCGTGAGG AGTTC	TATCCGACCGCTAAATA ACTTCC	AGAATTTGAGTGTGAGG AGTTT	CCAACCACTAAATAA
P14^{ARF}	GTGTTAAAGGGCGGCG TAGC	AAAACCCTCACTCGCGA CGA	TTTTTGGTGTTAAAGGGT GGTGTAGT	CACAAAAACCCTCAC
P15^{INK4b}	GCGTTCGTATTTTGGCG TT	CGTACAATAACCGAACG ACCGA	TGTGATGTGTTTGTATTT TGTGGTT	CCATACAATAACCAA
P16^{INK4a}	TTATTAGAGGGTGGGG CGCATCGC	GACCCCGAACGCGACCG TAA	TTATTAGAGGGTGGGGT GGATTGT	CAACCCCAAACCAAC
p73	GGACGTAGCGAAATCG GGTTC	ACCCCGAACATCGACGT CCG	AGGGGATGTAGT GAAATTGCGGTTT	ATCACAACCCCAAAC
MDR1	CTCTCTAAACCCGCGA ACGAT	TTGGGGGTTTGGTAGCG C	ACTCTCTAAACCCACAA ACAAT	GTTGGGGGTTTGGTA GTGT
MRP3	TTTCGTTTTACGGGTAT ATATTCGC	AAAATCACGTTCTCTCC GAAA	TTTTGTTTTATGGGTATA TATTTGT	AAAATCACATTCCTC

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los genes por MSP.

3.1.8.2. Determinación del contenido total de 5-metilcitosina en el ADN

El contenido total en el ADN de 5-Metilcitosina de las líneas celulares se determinó mediante electroforesis capilar (HPCE), como se ha descrito para muestras de pacientes.

3.2. MUESTRAS TUMORALES DE PACIENTES

Se obtuvieron 156 muestras de adenocarcinoma primario del Hospital de Madrid entre octubre de 2004 y marzo de 2006 bajo la supervisión del Dr. Emilio de Vicente y del *Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center of Medical Institutions of Baltimore*. Las muestras se tomaron tras la firma del consentimiento informado de los pacientes. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité ético de cada centro.

Se obtuvieron por resección quirúrgica previo consentimiento informado, 143 tumores colorrectales, 8 tumores primarios de mama, 3 carcinomas gástricos, un adenocarcinoma primario de pulmón y un carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. En cada resección se aislaron varios fragmentos de tejido tumoral y sano. Dichos fragmentos eran incluidos inmediatamente en OCT Tissue-TEK® de Sakura® (medio de congelación compuesto por glicoles y resinas hidrosolubles que forman una matriz de sostén del tejido que permite conservar todas las propiedades y estructuras del mismo) y congelados a -80°C hasta su procesamiento. Muchos eran fijados e incluidos en parafina para el estudio anatomopatológico y el bloque sobrante se utilizaba para nuestro estudio. Por otro lado, se tomaron muestras de sangre de cada paciente y también de 50 controles sanos.

Los parámetros de estudio fueron: sexo, edad, dieta rica o pobre en folatos, alcohol, estadio de Dukes y lateralidad en el caso de colorrectales, recidivas, grado de diferenciación, metástasis y número de ciclos de quimioterapia aparte de los datos de respuesta y toxicidad producidas por la droga y de los datos obtenidos a partir de las muestras biológicas.

3.2.1. Extracción de ácidos nucleicos de las muestras humanas

3.2.1.1. Extracción de ADN

Tanto de las muestras incluidas en parafina como en OCT, se hicieron unos 20 cortes de 15 micras y se introdujeron en un tubo eppendorf para proceder a la extracción de ADN. Tras desparafinar con xilol:

- 1- Resuspender en 400 µl de tampón SDS 1x en TE-9; añadir 7 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) a cada tubo.
- 2- Se deja a 58°C durante 16-24 h.
- 3- Al día siguiente se añaden unos 3 µl más de proteinasa K y dejarlo 1-1.5 h más a 58°C.
- 4- Poner los tubos a 95°C durante 8 min. para degradar la proteinasa K.
- 5- Se dejan a temperatura ambiente durante 15 min.
- 6- Dar un pulso en la centrífuga.

- 7- Añadir 400 μ l de fenol:cloroformo:isoamílico; agitar y centrifugar 15 min. a 10000 rpm.
- 8- Se coge con cuidado la fase acuosa y se transfiere a otro tubo para precipitar el ADN.
- 9- Precipitado del ADN añadiendo 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 10% de acetato sódico 3M a pH 5.5
- 10- Se deja toda la noche a -20°C
- 11- Al día siguiente se centrifuga a 13000 rpm durante 30 min.
- 12- Añadir 200 μ l de etanol al 70% al pellet y centrifugar a 13000 rpm durante 30 min. Quitar muy bien el etanol y dejarlo secar. Resuspender el ADN en 50 μ l de agua estéril.

3.2.1.2. Extracción de ARN

En el caso de la extracción de ARN, se realizaron 40 cortes de 15 micras de cada muestra puesto que se degrada con mayor facilidad que el ADN. Los tejidos incluidos en parafina, primero se desparafinaron con xilol; posteriormente se siguió el protocolo de extracción de ARN igual que para los tejidos en OCT:

- 1- Añadir 1 ml de Trizol a cada tubo.
- 2- Homogeneizar bien las muestras pasándolas por jeringas de distintos grosores. (Rápidamente y manteniendo las muestras en hielo para que el ARN no se degrade).
- 3- Se añaden 0.2 ml de cloroformo y se agita bien en *vortex*.
- 4- Incubar 2-3 min a temperatura ambiente.
- 5- Centrifugar la mezcla a 12000 rpm durante 15 min a 4°C . La mezcla se separa en dos fases: orgánica y acuosa, ésta última, que es la superior, se transfiere a un tubo limpio.
- 6- A continuación se procede a la purificación del ARN con el *kit de Qiagen (Rneasy Mini Kit)*:
 - 7- Se añade a la fase acuosa un volumen de etanol al 70% y se mezcla por inversión.
 - 8- Se aplican 700 μ l de la mezcla a una columna del kit.
 - 9- Centrifugar 15 seg a 12000 rpm y se vacía el tubo colector.
 - 10- Repetir con el resto del volumen de la mezcla.
 - 11- Lavar con 700 μ l de Buffer RW1 y centrifugar 15 seg a 12000 rpm.
 - 12- Cambiar el tubo colector y añadir 500 μ l del Buffer RPE a la columna.
 - 13- Centrifugar 15 seg a 12000 rpm.
 - 14- Repetir el paso 11 y centrifugar 2 min para secar la columna.
 - 15- Vaciar el tubo colector y centrifugar durante 1 min para secar.

16- Transferir la columna a un tubo nuevo y añadir 30 µl de agua libre de ARNasas precalentada a 50°C.

17- Incubar 2 min y eluir.

3.2.2. Análisis de Inestabilidad de Microsatélites (MSI)

El análisis de Inestabilidad de Microsatélites se llevó a cabo en las muestras de ADN de tejido tumoral en parafina o congelado en OCT procedentes de pacientes de cáncer colorrectal. Se realizaron las PCRs de los microsatélites BAT25 y BAT26. Los productos de PCR se corrieron por electroforesis en geles de acrilamida al 12%, teñidos con bromuro de etidio. El tamaño de las bandas de los diferentes alelos se obtuvo por comparación con un patrón de peso molecular de 100 pares de bases (*Promega DNA-Ladder*).

3.2.3. Análisis del genotipo de los genes del metabolismo del 5-Fluorouracilo, genes reparadores, detoxificantes y del metabolismo de grupos metilo

A partir del ADN extraído de las muestras tumorales y normales, se llevó a cabo un genotipado de los pacientes. Dicho genotipado se realizó de acuerdo con los métodos previamente descritos de PCR-RFLP (amplificación por PCR seguida de detección de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción enzimática). Para cada polimorfismo, los cebadores, enzimas y fragmentos de restricción se muestran en la tabla 4.

Se emplearon 50-100 ng de ADN y condiciones estándar de PCR con Taq polimerasa. El producto de PCR se cargó en un gel de agarosa al 3% junto a un patrón de peso molecular de 100 pares de bases y se realizó una electroforesis de entre una y dos horas a 90V. El gel fue teñido con bromuro de etidio y analizado bajo luz ultravioleta.

Una vez visualizado el fragmento de PCR y comprobado que es correcto, se procedió a la digestión enzimática (RFLP) del producto de PCR con las enzimas de restricción correspondientes en cada caso. Normalmente el SNP presente en el fragmento génico suprime o genera una diana de restricción. De este modo, el tamaño del fragmento generado a partir de la digestión con la enzima adecuada, determina el genotipo de la muestra. El patrón de peso molecular de 100 pares de bases permite estimar el tamaño de cada banda.

La mezcla de digestión se mantuvo a 37°C durante al menos 3 horas y después se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio bajo la lámpara UV.

GEN	Polimorf.	CEBADORES	Enzima Restricc.	FRAGMENTOS RESTRICCIÓN
<i>TYMS</i>	T₅ER	D: 5' GTG GCT CCT GCG TTT CCC CC 3' R: 5' GCT CCG AGC CGG CCA CAG GCA TGG CGC GG 3'	Hae III	2R:215pb 3C:66+47+45+44+28+12pb 3C:94+47+45+44+12pb
	3'UTR	D: 5' ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA 3' R: 5' TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT 3'	Alw261	+6pb/+6pb:158pb +6pb/-6pb:158+152 -6pb/-6pb:152
<i>MTHFR</i>	C677T	D: 5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3' R: 5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3'	Hinf I	WT:198pb Het:198+175+23pb Mut:175+23pb
	A1298C	D: 5' GCA AGT CCC CCA AGG AGG 3' R: 5' GGT CCC CAC TTC CAG CAT C 3'	Mbo II	WT:79+37+29pb Het:108+79+37pb Mut:108+37pb
<i>CBS</i>	In₁ 68pb	D: 5' CTG GCT TGA GCC CTG AA 3' R: 5' GGC CGG GCT CTG GAC TCC 3'		WT:184pb Het: 184+252pb Mut: 252pb
<i>MS</i>	A2756G	D: 5' GAA CTA GAA GAC AGA AAT TCT CTA 3' R: 5' CAT GGA AGA ATA TCA AGA TAT AGA 3'	Hae III	WT:189pb Het: 189+159+30pb Mut: 159+30pb
<i>GSTP1</i>	A313G	D: 5' CTC CGC TCC AAA TAC 3' R: 5' TCTCCCTCATCTACA 3'	Alw261	WT:176pb Het 176+91+85pb Mut:91+85pb
<i>XPD</i>	Lys751Gln	D: 5' CCT CTC CCT TTC CTC TGT TC 3' R: 5' CAG GTG AGG GGG ACA TCT 3'	Mbo II	control cut:131 WT:98+505pb Het:98+505+603pb Mut:603pb
	Ile199Met	D: 5' CTG TTG GTG GGT GCC CGT ATC TGT TGG TCT 3' R: 5' TAA TAT CGG GGC TCA CCC TGC AGC ACT TCC T 3'	Mbo I	control cut:357 WT:173+176pb Het:173+176+243pb Mut:243pb
<i>XRCC1</i>	C194T	F: 5' GCC CCG TCC CAG GTA 3' R: 5' CCC AAG ACC CTT TCA CT 3'	Msp I	WT:174+292pb Het:174+292+311pb Mut:174+311pb
	G399A	F: 5' TGC TTT CTC TGT GTC CA 3' R: 5' TCC AGC CTT TTC TGA TA 3'		WT:241+374pb Het:241+374+615pb Mut:615pb
<i>XRCC3</i>	C241T	F: 5' GCC TGG TCA TCG ACT C 3' R: 5' ACA GGG CTC TGG AAG GCA CTG CTC AGC TCA CGC ACC 3'	Nco I	WT:136pb Het:136+97+39pb Mut:97+39pb

Tabla 4: Relación de genes amplificados por PCR-RFLP. Se muestran los cebadores y enzimas de restricción utilizados para cada polimorfismo, así como los tamaños de los fragmentos correspondientes a los diferentes genotipos.

3.2.4. Análisis del estado de metilación de las islas CpG

Los patrones de metilación de ADN en las islas CpG de genes de la ruta del 5-FU, genes detoxificantes, reparadores y de ciclo celular se determinaron por conversión química de las citosinas no metiladas, pero no de las metiladas, a uracilo mediante el tratamiento con bisulfito sódico; y posterior amplificación por PCR específica de metilación (MSP) utilizando oligonucleótidos específicos para las secuencias metilada y no metilada del ADN en dos reacciones independientes.

3.2.4.1. Tratamiento con bisulfito sódico

Brevemente, 1µg de ADN de tejido normal, tumoral o procedente de un pellet de líneas celulares, se resuspendió en 50µl de agua Milli-Q y se desnaturizó con NaOH 0.3M durante 10 minutos a 37°C. A este ADN desnaturizado se le añadieron 550 µl de una solución recién preparada de Hidroquinona 10mM (Sigma) y Bisulfito Sódico 3M a pH 5.0 (Sigma). La mezcla con el ADN se cubrió con aceite mineral estéril y se incubó durante 16 horas a 50°C. Tras este tiempo, la solución de ADN se purificó para eliminar las sales a través de una columna (Wizard DNA Clean-up system, Promega), y se trató de nuevo con NaOH 0.3M durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió una mezcla de acetato de amonio 10M y glicógeno y se precipitó el ADN con etanol absoluto. El ADN tratado con bisulfito se resuspendió en 25µl de agua Milli-Q, usándose inmediatamente o congelándose a -80°C.

3.2.4.2. PCR específica de metilación (MSP)

El ADN modificado se utilizó como molde para la amplificación por PCR mediante oligonucleótidos específicos tanto para el ADN metilado como para el no metilado.

Puesto que el tratamiento con bisulfito sódico convierte las citosinas no metiladas en uracilos, dejando intactas las citosinas metiladas, se diseñaron oligonucleótidos adaptados a estos cambios que podían discriminar hebras metiladas de no metiladas.

Para las MSPs se emplearon 1-2µl de ADN tratado, y unas condiciones estándar, con Taq polimerasas “hot Start”. Los genes seleccionados para caracterizar el estado de metilación en las muestras procedentes de pacientes fueron: **p16^{INK4a}**, **p14A^{RF}** (genes de ciclo celular), **MGMT**, **APC**, **hMLH1** (genes de reparación del ADN dañado), LKB1, CRBP1, RARb (genes supresores de tumores), **MINT1**, **MINT2** y **MINT31** (marcadores de metilación en tumor). Los oligonucleótidos y las condiciones de PCR se han descrito previamente (Esteller et al., 1998, Esteller et al., 2000).

El **fenotipo metilador de islas CpG (CIMP)** positivo fue definido arbitrariamente respecto a la frecuencia de metilación, considerándose positivas aquellas muestras que presentaban 2/7 o más genes metilados. Los siete genes considerados tradicionalmente para determinar el fenotipo CIMP son los que aparecen en negrita en el párrafo anterior.

3.2.4.3. Determinación del contenido total de 5-metilcitosina en el ADN

El contenido total de 5-Metilcitosina en el ADN procedente de pacientes y líneas celulares se determinó mediante electroforesis capilar (HPCE), como se ha descrito previamente (Esteller et al., 2001. Fraga et al., 2000). El ADN (0.5-1 microgramo) se incubó en 20 µl de ácido fórmico al 88% (volumen a volumen), a 140°C durante 90 min. Tras la hidrólisis, las muestras fueron liofilizadas por speed-vac (Savant SC 200). Finalmente, las muestras secadas hidrolizadas se resuspendieron en 2 µl de agua Milli-Q y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. En el sistema de Electroforesis Capilar se utilizó un capilar de sílice fundida no recubierto (600 mm por 0.075 de diámetro interno, longitud efectiva 540 mm; WATERS CHROMATOGRAPHY S.A.), conectado a una estación de procesamiento de datos. El tampón de electroforesis fue 24mM NaHCO₃ (pH 9.6) con 36mM SDS, y se efectuó a 20kV y 25°C. La absorbancia de la columna se monitorizó a 256nm. Se llevaron a cabo 3 réplicas de cada muestra analizada. El grado relativo de metilación en las muestras de ADN se midió como el porcentaje de mC de las citosinas totales, calculado como: (área del pico 5mdC x 100) / (área del pico dC + área del pico 5mdC).

3.2.5. Expresión de ARNm de TYMS y DPYD en muestras tumorales de pacientes

Se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa, como se detalla a continuación.

3.2.5.1. Retrotranscripción /Transcripción Inversa (RT)

A partir de 1 µg del ARN extraído se realizó una retrotranscripción con el kit Reverse Transcription System de Promega en un volumen final de 20 µl.

3.2.5.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La cantidad de ADNc utilizado en la reacción de PCR cuantitativa fue de 2 µl procedentes de una dilución 1/10 del volumen resultante en la RT.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl. Cada reacción contenía 200nM de cada cebador específicos del transcrito a amplificar (Tabla 5) y 5 µl de Sybr Green® (Applied Biosystems®).

GEN	CEBADOR F	CEBADOR R
<i>TYMS</i>	5'GAATCACATCGAGCCACTGAAA3'	5'CAGCCCAACCCCTAAAGACTGA3'
<i>DPYD</i>	5'AATGATTCTGAAGAGCTTTTGAAGC3'	5'GTTCCCCGGATGATTCTGG3'

Tabla 5: Se muestran las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar por qPCR los genes *TYMS* y *DPYD*.

Se utilizó el gen constitutivo *GAPDH* como control interno de la reacción y para asegurar la calidad del ADNc. Las condiciones de la reacción de qPCR fueron 50°C durante 2min, 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C 1 minuto. Tras la reacción de PCR, se realizó una curva de disociación de 95°C durante 15 segundos seguida de 60°C durante 15 seg. Todas las reacciones se realizaron por duplicado en placas ópticas de 384 pocillos de *Applied Biosystems* en la PCR cuantitativa ABI PRISM 7900HT FAST de la misma casa.

El análisis de resultados se llevó a cabo como se detalla en el apartado 5.3 de materiales y métodos.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia estadística de las variables cuantitativas se realizó utilizando procedimientos no paramétricos, como el test de Kruskal-Wallis y el test de Dunn, que facilita las comparaciones múltiples. Mientras, las variables categóricas se compararon utilizando el test de χ^2 y el test de Fisher. Para las variables continuas, las diferencias entre muestras independientes se evaluaron mediante ANOVA de una vía (Mann-Whitney-Wilcoxon), y para las comparaciones múltiples, con el fin de comprobar si existía interacción entre algunos parámetros clinicopatológicos, se utilizó el test de ANOVA de dos vías. Los análisis se realizaron con los.

Para el análisis de los diferentes polimorfismos, primero se comprobó que la población se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg. Para ello se aplicó la fórmula estipulada y se aceptó como diferencia significativa únicamente aquellas cuyo p-valor era menor de 0.05. Ninguno de los polimorfismos estudiados se encontraba en desequilibrio. El análisis de haplotipos nos permitió observar la asociación entre los pares de polimorfismos y su efecto conjunto en las diferentes variables relacionadas con el estado de metilación del ADN tumoral y con la respuesta a 5-FU.

Para el análisis estadístico de las PCRs cuantitativas se evaluaron los coeficientes de correlación de los distintos genes para la expresión de ARNm de líneas celulares tratadas con distintas dosis de la droga. La significación fue confirmada mediante el test de ANOVA.

IV. RESULTADOS

RESULTADOS I: LÍNEAS CELULARES

4.1.2. Caracterización de la sensibilidad de las líneas celulares

Inicialmente, se caracterizaron las líneas celulares utilizadas en los ensayos de sensibilidad y respuesta a 5-FU/oxaliplatino.

El índice de sensibilidad IC₅₀ (dosis necesaria de 5-FU para inhibir el 50% del crecimiento celular, es decir, la mitad de la concentración inhibitoria total de la droga), se obtuvo de la base de datos del NCI (*National Cancer Institute*, Instituto Nacional del Cáncer de EEUU) y se comprobó con ensayos de MTT.

El índice de sensibilidad IG₅₀ (dosis inhibitoria del crecimiento del 50% de la población en cultivo) se midió por ensayos de inhibición de crecimiento. El IG₅₀ mide el poder inhibitorio del crecimiento de la droga, mientras que el IC₅₀ mide el poder citotóxico.

4.1.2.1. Ensayo de MTT y de inhibición del crecimiento para determinar los índices de 5-FU IC₅₀ e IG₅₀ en cada línea celular

Como punto de referencia, se tomaron los índices IC₅₀ de la base de datos del Instituto Nacional del Cáncer en EEUU, se realizaron ensayos con Sal de Tetrazolio (MTT) para determinar la viabilidad celular tras exposición a 5-FU en las 17 líneas del estudio. Se analizaron por MTT las dosis de 5-FU inhibitorias del 50% del crecimiento celular para determinar qué líneas eran sensibles y cuáles eran resistentes a 5-FU. Con los datos obtenidos, concluimos que SW48 y SW620 eran resistentes a 5-FU, mientras que el resto de las líneas ensayadas eran sensibles (Figuras 17 y 18).

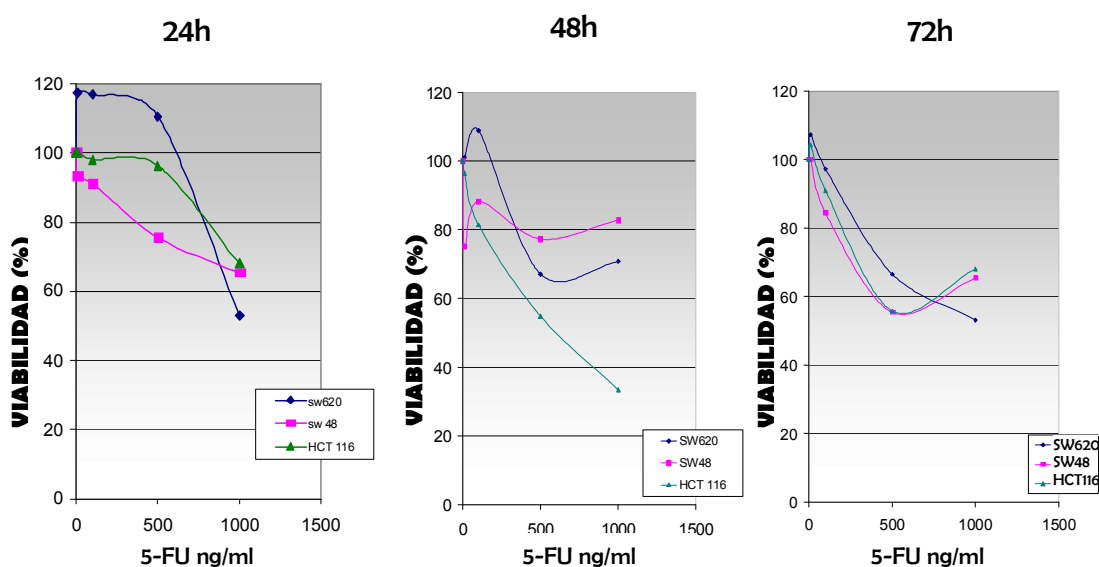


Figura 17: Citotoxicidad celular del 5-FU administrado durante 24, 48 y 72 horas a diferentes dosis en líneas resistentes (SW620 y SW48) y sensibles (HCT-116) a la terapia. Los resultados indicaron que tanto SW620 como SW48 eran resistentes al tratamiento con 5-FU, mientras HCT-116 era sensible al mismo. No obstante, parece que el efecto empieza a observarse a partir de las 48 horas de exposición.

La línea celular SW620 después de 48 y 72 horas de exposición puede crecer a 100uM. Mientras, SW48 parece un poco más sensible a 5-FU. Aun así, mantiene el 80% de viabilidad cuando el agente está en el medio a concentraciones de 100uM.

HCT-116 mantiene su viabilidad al 100% a altas dosis de 5-FU las primeras 24 horas. No obstante, en cuanto se produce un efecto acumulativo del agente en las células, éstas empiezan a morir (véase que la población decrece un 20% a concentraciones inferiores a 100uM). En HCT-116, al igual que en SW48, parece producirse una recuperación de la población tras la exposición prolongada a dosis elevadas de 5-FU. En realidad, podría ser debido a un efecto selectivo producido por la propia droga. Es decir, sólo sobreviven aquellas células capaces de crecer con altas concentraciones de 5-FU en el medio de cultivo.

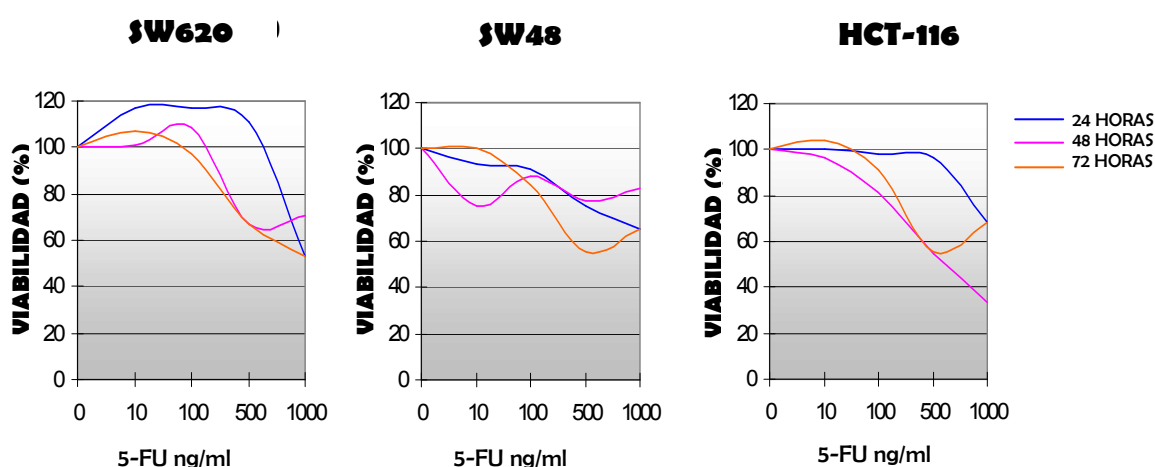


Figura 18: Porcentaje de viabilidad de las líneas celulares SW620, SW48 (resistentes a 5-FU) y HCT-116 (sensible a 5-FU) tratadas con diferentes dosis de la droga durante 24, 48 y 72 horas. Los resultados indicaron que SW620 era resistente a 5-FU independientemente del tiempo de exposición, mientras que SW48 era resistente sólo durante las primeras 48 horas. La línea celular SW620 sigue creciendo incluso a dosis de 500uM al cabo de 24 horas de tratamiento. La dosis de 1000 uM reduce la población a la mitad al cabo de 24 horas, ésta parece recuperarse tras 48 horas de exposición (línea rosa), puede que se produzca una selección de las células resistentes. Mientras, SW48 parece un poco más sensible a 5-FU. HCT-116 mantiene su viabilidad al 100% a altas dosis de 5-FU las primeras 24 horas. En HCT-116, al igual que en SW48, parece producirse una recuperación de la población tras la exposición prolongada a dosis elevadas de 5-FU.

Parece que la repetida exposición a dosis muy elevadas de 5-FU producía una selección artificial tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU. Por tanto, es posible que superado un determinado umbral de concentración, algunas células fueran capaces de crecer como si se hubieran generado clones resistentes a la droga (Figuras 17 y 18). Por el patrón de viabilidad, es posible que la línea celular SW48 se adapte a la presencia de la droga en el medio, ya que se observa que la población decrece hasta el 80% al cabo de 48 horas de exposición a dosis bajas de 5-FU (10uM) y transcurridas 72 horas, en cambio, la viabilidad vuelve a aumentar hasta el 100%.

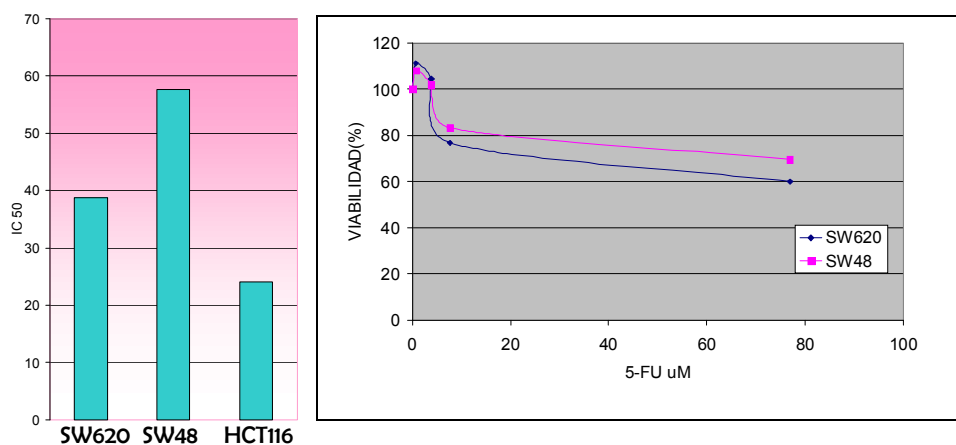


Figura 19: (A) IC50 de las líneas celulares SW620, SW48 y HCT-116. Las dos primeras son resistentes mientras que la segunda es sensible a 5-FU. (B) Viabilidad en líneas celulares resistentes a 5-FU. A altas dosis de 5-FU, ninguna de las dos poblaciones disminuye por debajo del 60% de viabilidad.

Según estos resultados, el IC50 no es representativo de lo que se observa después *in vitro* en escalados de dosis-tiempo (Figura 19). Parece que la hipótesis de la existencia de una resistencia acumulativa cobra más fuerza. Es posible que se produzca un efecto acumulativo de la droga que conlleva una selección de clones resistentes de entre las células del cultivo de una misma línea. Esta dosis no se relacionaría con el IC50. Sino que a partir de este efecto acumulativo algunas líneas aparentemente sensibles podrían volverse resistentes tras tan solo 48 horas de exposición a altas dosis del fármaco.

A partir de los ensayos de inhibición de crecimiento en las ocho líneas celulares de colon (HCT116, DLD1, HT29, SW620, CaCo2, LoVo, SW48 y SW480), se determinó la concentración a la cual se inhibía el 50% del crecimiento de las células cancerosas (IG50). Estos análisis indicaron que la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de SW620 era entre 5 y 8 veces superior a la del resto de líneas ensayadas (tabla 5). SW480 también mostró un elevado IG50, aunque el índice IC50 obtenido de la base de datos del NCI era bajo. Por tanto, se necesita más dosis de 5-FU para inhibir su crecimiento pero luego es sensible, puesto que no evade apoptosis ni presenta mecanismos de resistencia al tratamiento.

4.1.2.2. Ensayos MTT para medir sensibilidad a 5-FU en líneas celulares de colon cultivadas en medios pobres en folato

Se cultivaron líneas celulares de colon en medios pobres en ácido fólico, de manera que la concentración presente en el medio no excediera de la que puede encontrarse en plasma en humanos. Esta depleción se llevó a cabo con la intención de determinar si la sensibilidad a

5-FU estaba mediada por este nutriente, puesto que en los medios de cultivo el folato se encuentra habitualmente en exceso.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6 y figura 20, resultando las diferencias en IG50 en ambas condiciones claramente significativas (t-test, $p=0.0302$). Por tanto, parece que los niveles de ácido fólico presentes en el medio son determinantes de la sensibilidad en líneas celulares de colon, de forma que las células son significativamente más sensibles al tratamiento cuando se les priva de la fuente de folato.

Algunos autores habían demostrado que la expresión de TS aumenta cuando los niveles de folato disminuyen (Peter et al., 2000). No obstante, estos niveles de folato son intracelulares, y los que medimos en plasma o en medio de cultivo están en forma oxidada, ya que provienen de la excreción celular.

Línea celular	5FU IG50	5FU IG50/medio bajo en folato
HCT116	4.02	3,09
DLD1	2.95	2,79
HT29	5.04	4,26
SW620	24.58	20,58
CaCo2	3.23	1,95
LoVo	2.29	0,87
SW48	4.92	3,74
SW480	11.46	5,03

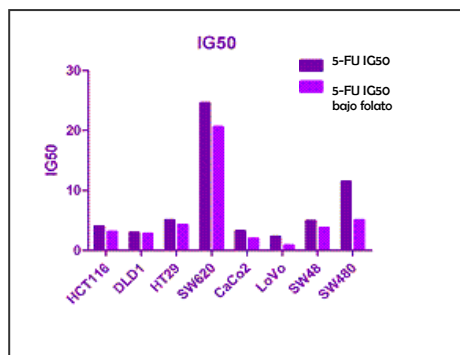


Tabla 6 y Figura 20: Se muestra el índice IG50 de las ocho líneas celulares de colon cultivadas en medio normal y en medio bajo en folato. Los datos estadísticos demostraron que la depleción de folato en el medio producía una disminución significativa en los índices IG50 de todas las líneas ensayadas (t-test, $p=0.0302$). Por tanto, la inhibición del crecimiento debida a la droga era más efectiva en presencia de niveles bajos de folato.

A raíz de estos resultados, nos planteamos estudiar el efecto de la dieta en pacientes de cáncer colorrectal, para comprobar si la ingesta de folato también podía asociarse con una mejor o peor respuesta a 5-FU en estos pacientes.

4.1.2.3. Ensayos clonogénicos para determinar la capacidad de formar colonias de las líneas celulares de colon tras la exposición a distintas dosis de 5-FU

Se realizaron ensayos clonogénicos con las ocho líneas celulares de colon (HCT-116, DLD1, HT29, SW620, CaCo2, LoVo, SW48 y SW480) para determinar la capacidad de formar colonias de estas líneas celulares cuando se exponían a diferentes dosis de 5-FU.

Los resultados alcanzados se muestran en la tabla 7. Se puede apreciar que la capacidad clonogénica de SW620 es muy elevada tanto a concentraciones bajas de 5-FU

como a dosis de 500uM. Entre las líneas más sensibles, destaca la escasa capacidad de formar colonias de HCT-116 a dosis de 50uM, que mostró gran sensibilidad a 5-FU en el resto de los ensayos.

También se aprecia que SW480, a pesar de tener un índice IG50 elevado, tenía poca capacidad clonogénica, así como bajo IC50 (diez veces inferior al de SW48 y veinte veces inferior al de SW620). Es decir, que la dosis de 5-FU necesaria para inhibir su crecimiento es bastante alta. Sin embargo, no presenta mecanismos de resistencia como evasión de la apoptosis, a diferencia de las líneas resistentes con altos IC50 y capacidad clonogénica, como es el caso de SW620.

Línea	clonogenicidad (5FU)		
	5	50	500
HCT116	0,85	0,24	0,08
DLD1	0,94	0,5	0,16
HT29	0,92	0,7	0,14
SW620	1,07	0,95	0,89
CaCo2	0,99	0,57	0,14
LoVo	0,9	0,76	0,27
SW48	0,97	0,85	0,71
SW480	0,86	0,59	0,13

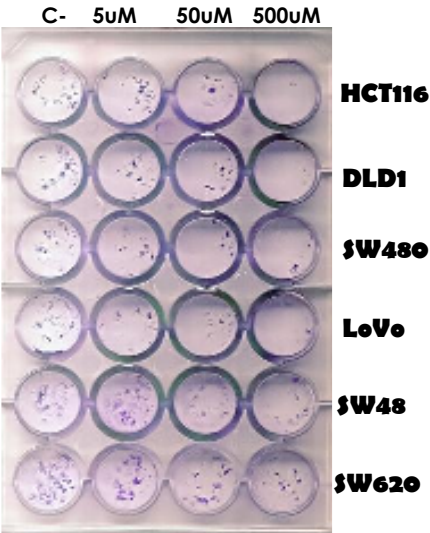


Tabla 7: Se muestran los resultados de los ensayos clonogénicos (la fotografía muestra una placa p24 con las colonias formadas por algunas líneas de colon tratadas con diferentes dosis de 5-FU). El valor IG50, así como la capacidad clonogénica es muy superior en la línea SW620, lo que conlleva muy baja sensibilidad a 5-FU con respecto al resto de las líneas de colon. La línea SW480 mostró un valor elevado de IG50, lo que demuestra que es necesaria una dosis más alta de 5-FU para inhibir su crecimiento, pero no es resistente a la droga, puesto que no presenta mecanismos de resistencia y su índice IC50 y clonogenicidad no son elevados. Los valores de clonogenicidad están normalizados con respecto al control sin tratamiento, de forma que representan porcentajes relativizados al 100% (valor 1) del control negativo. Suponiendo que de las 5×10^5 células plaqueadas, se han obtenido 100 colonias en el control negativo SW620, en SW620 tratadas con 5uM de 5-FU se han obtenido 107 colonias, y así sucesivamente.

4.1.3. Genotipado de líneas celulares

Se genotiparon, mediante PCR-RFLP (como se indica en materiales y métodos), las líneas celulares MCF-7, Hs578T, HCC1937, SW-620, SW-480, SW-48, HCT-116, DLD-1, CACO-2, LoVo, HT-29, A549, H441, HELA, SW756 y HL-60 para los diferentes polimorfismos de los genes implicados en la ruta metabólica del 5-Fluorouracilo (*TYMS*, *MTHFR*) así como genes reparadores del ADN dañado (*XPD*, *XRCC*), detoxificantes (*GSTP1*) y del metabolismo de grupos metilo y ácido fólico (*MTHFR*, *CBS*, *MS*) (Tabla 8):

	Homoc silvestre(%)	Heterocigoto (%)	Homoc mutante (%)
Tβ	2R/2R 76,5	2R/3G 11,7 2R/3C 5,9	3G/3G 0 3C/3C 5,9
UTR	+6pb/+6pb 0	-6pb/+6pb 27,8	-6pb/-6pb 72,2
GβTP1	313AA 55	313AG 30	313GG 15
MTHFR	677CC 38,5	677CT 38,5	677TT 23
MTHFR	1298AA 50	1298AC 21,4	1298CC 28,6
CBβ	NN [*] 42,9	NI [*] 50	II [*] 7,1
Mβ	2756AA 57,1	2756AG 28,6	2756GG 14,3
XPD	199AA 100	199AG 0	199GG 0
XPD	751AA 40	751AC 30	751CC 30
XRCC399	399GG 57,1	399GA 35,7	399AA 7,2
XRCC194	194CC 91	194CT 9	194TT 0

Tabla 8. Frecuencias genotípicas en las líneas celulares analizadas.**CB β* : (N) No inserción 68pb,(I) Inserción 68pb. Por lo general, en la mayor parte de los polimorfismos analizados el alelo que se presentaba con mayor frecuencia era el alelo normal, con la excepción de los polimorfismos de los genes *CB β* , *MTHFR*677T y *TYMS* 3'UTR. El polimorfismo de la delección de 6pb en el extremo 3'UTR de *TYMS* se presentaba mucho más frecuentemente que el alelo normal. De hecho, no se encontró ningún homocigoto silvestre.

En los genes de la ruta metabólica del 5-FU, se encontró que las frecuencias genotípicas para el polimorfismo TSER variaban en gran medida con respecto a las encontradas en pacientes, donde había tan solo 15% vs 76.5% 2R/2R y 30% vs 5.9% 3C/3C. Dado que el número de líneas celulares era limitado, entendemos la necesidad de ampliar el estudio con el fin de determinar si el patrón de frecuencias genotípicas se adapta o no y si varía en función del tipo de línea.

La frecuencia de distribución del polimorfismo presente en el extremo 3'UTR de *TYMS* era inesperada, dado que no se encontraron líneas celulares con genotipo homocigoto silvestre. El alelo delecionado (-6pb) provoca inestabilidad en el ARNm de *TYMS*, por lo que la célula tendría niveles disminuidos de esta enzima. Este alelo parece haberse seleccionado evolutivamente, lo que podría indicar que confiere cierta ventaja selectiva a la célula.

En el gen *MTHFR*, el polimorfismo C677T daba lugar a un genotipo heterocigoto que aparecía con la misma frecuencia que el homocigoto silvestre. Del mismo modo que en *TYMS*, la distribución de dicho polimorfismo variaba significativamente con respecto a las muestras tumorales de pacientes. En líneas celulares el genotipo homocigoto silvestre aparecía con menor frecuencia que en pacientes (38.5 vs 46.4%) y en cambio aparecía más frecuentemente el homocigoto mutante (23% vs 15%). Además, como se comentará más adelante, en algunos pacientes en los que el tejido tumoral tenía mutaciones, presentaban línea germinal con genotipo normal.

El resto de polimorfismos no presentaba distribuciones distintas de las encontradas en la población de pacientes.

4.1.4. Estado de metilación de islas CpG en líneas celulares

La desregulación epigenética, junto con las mutaciones, es fundamental en el proceso carcinogénico. Por ello, decidimos analizar 17 líneas celulares de mama, colon, pulmón, cervix y leucemia, muchas de ellas pertenecientes al panel NCI-60. Evaluamos el estado de metilación de islas CpG en los promotores de los genes que participan en la ruta del folato y del 5-fluorouracilo (*TYMS*, *TP*, *DPYD*, *MTHFR*), genes detoxificantes (*GSTP1*), genes reparadores del ADN dañado (*XPD*, *MGMT*, *MLH1*), genes de regulación del ciclo celular (*p14^{ARF}*, *p15^{IN4b}*, *p16^{INK4a}*, *p73*), y genes de resistencia a drogas (*MDR1*, *MRP3*) (Tabla 9).

	NOMBRES GENES	U	M	U/M	DELEC
GENES METABOLISMO 5FU	<i>TYMS</i>	92,3		7,7	
	<i>TP</i>	46,2	7,7	46,1	
	<i>DPYD</i>	92,3	7,7		
	<i>MTHFR</i>	92,3	7,7		
GENES DETOX	<i>GSTP1</i>	80	20		
GENES REPARADORES	<i>XPD</i>	73,3	20	6,7	
	<i>MGMT</i>	35,7	28,6	35,7	
GENES DE RESIST. A DROGAS	<i>MDR1</i>	66,7	11,1	22,2	
	<i>MRP3</i>	50	37,5	12,5	
GENES CICLO CELULAR	<i>p14</i>	54,6	27,3	9,1	9,1
	<i>p15</i>	90,9			9,1
	<i>p16</i>		63,6	27,3	9,1
	<i>p73</i>	83,3	8,4	8,3	

Tabla 9: estado de metilación de las islas CpG de los diferentes promotores analizados en líneas celulares. **U:** % líneas celulares con isla CpG del promotor No metilada. **M:** % líneas celulares con isla CpG del promotor Metilada; **U/M:** % líneas celulares con isla CpG del promotor Hemimetilada (sólo un alelo metilado). **Delec:** Porcentaje de líneas celulares que presentaban el gen con delección homocigota.

El promotor de *p16^{INK4a}*, inhibidor del ciclo celular, se encontraba hipermetilado o hemimetilado en casi todas las líneas, excepto en un 10% de ellas, donde se encontró delecionado. En ambos casos el efecto sobre la transcripción del gen sería similar, por lo que se pone de manifiesto su papel esencial en la superación de la senescencia en líneas celulares en cultivo.

Existía un 9.1% de las líneas que tenían delección homocigótica de *p14^{ARF}*, *p15^{IN4b}* y *p16^{INK4a}*. Es importante señalar que ninguna de estas líneas era de colon.

GSTP1, gen detoxificante de ADN, no presentaba metilación aberrante en líneas de colon, mientras que sí lo hacía en mama (MCF-7 y HCC1937).

Los genes de reparación se presentaban generalmente metilados o hemimetilados en las líneas de colon. *MGMT* presentaba un porcentaje de metilación superior al 40% en la población de líneas celulares. El estado hipermetilado de *MGMT* se podría asociar con un fenotipo de incrementada susceptibilidad a las mutaciones, y por ello, generar mutaciones en genes asociados a cáncer. De hecho, la mayoría de las líneas con este gen metilado tenían mutaciones en alguno de los genes de las rutas de reparación *NER* y *BER*.

4.1.4.1. Patrones de metilación de islas CpG en líneas celulares

Uno de los principales análisis innovadores en esta tesis es la evaluación del estado de metilación de los genes que participan en la ruta metabólica del 5-Fluorouracilo. Hasta la fecha, únicamente se habían caracterizado los polimorfismos presentes en estos genes, así como su expresión, pero nunca las islas CpG presentes en sus promotores. Dado que algunos de ellos tienen regulación post-transcripcional, decidimos comprobar si *TYMS*, *TP* y *DPYD* tenían regulación epigenética.

4.1.4.1.1. Patrones de metilación de *TYMS*, *TP* y *DPYD*

Al analizar la frecuencia con que aparecen metiladas las islas CpG estudiadas, se vio que existían ciertas asociaciones entre el estado de metilación de algunos genes. En el caso de los genes que actúan en la ruta metabólica del 5-FU, se vio que cuando el promotor de *TYMS* aparecía no metilado, también aparecían no metilados los promotores de *DPYD* (χ^2 , $p=0.0003$), y *p73* (χ^2 , $p=0.0016$). Parece que, en general, los genes *TYMS* y *DPYD* no se encuentran metilados en líneas celulares.

Hasta donde tenemos entendido, es la primera vez que se describe metilación aberrante del promotor de *TYMS* (Figura 21). La isla del promotor de *TYMS* se encontró hemimetilada en la línea SW48 que, por otra parte, se ha descrito como resistente a 5-Fluorouracilo (Morita et al., 2006). Aun así, encontramos que 72 horas después de haber retirado la droga del medio en aquellos cultivos expuestos a dosis de 500uM de 5-FU, la expresión de *TYMS* aumentaba hasta casi el doble del control sin tratar. No obstante, esta línea presentaba el alelo 3G del polimorfismo en el promotor de *TYMS*, por lo que no sabemos si la expresión de esta enzima se encontraba regulada a nivel epigenético además de a nivel genético. Por otro lado, también detectamos expresión de *TYMS* en SW48 por inmunotinción. Dado que existe expresión de *TYMS* en estas células, parece que la metilación no silenciaba el gen, si bien podría tener un papel en algún tipo de regulación transcripcional.

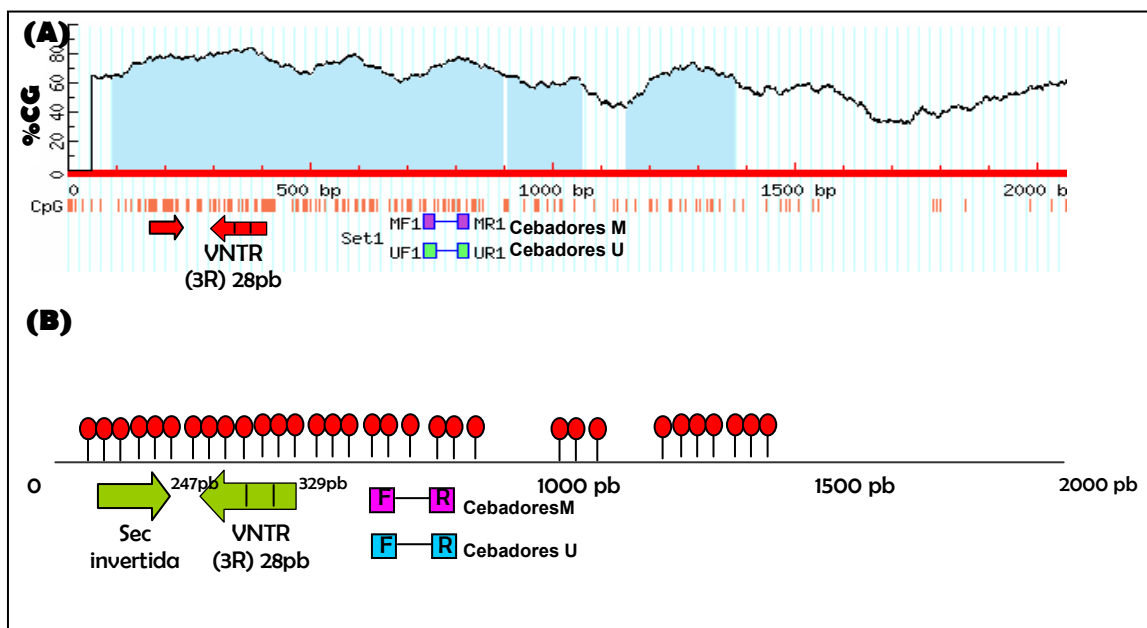


Figura 21: Promotor de *TYMS*. La figura (A) muestra la localización de las tres islas CpG presentes en el promotor de *TYMS* (sombreado azul). La flecha roja sitúa las repeticiones en TANDEM de 28pb, correspondientes a las verdes en (B). Corriente abajo, se muestran los cebadores utilizados para la MSP. (B) Representación esquemática de las tres islas CpG del promotor de *TYMS*, localización de las VNTR y de los cebadores utilizados en la MSP. Las tres islas CpG se localizan entre los nucleótidos 94 y 899 (806pb en total), 910 y 1061 (152 pb) y entre 1153 y 1737 (221 pb), tomando como punto 1 de la secuencia el nucleótido número 657 de la secuencia promotora registrada en el NCBI con el número [D00596](#).

Un dato de impacto fue el que obtuvimos al evaluar la metilación aberrante del promotor de *TP*. Encontramos que este gen presentaba al menos un alelo metilado en el 44% de las islas analizadas (Figura 22). Esta hipermetilación aberrante del promotor de *TP*, al igual que la del promotor de *TYMS*, tampoco se había descrito con anterioridad.

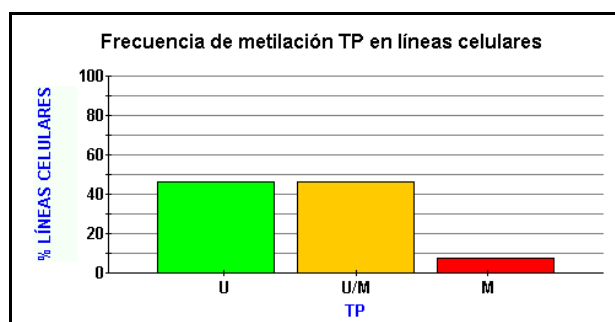


Figura 22: Estado de metilación de *TP* en las 17 líneas celulares analizadas. Se observa que un 44% de las líneas mostraban metilación en al menos uno de los alelos de *TP*.

Puesto que *TP* es la principal enzima de activación del 5-FU, postulamos la posibilidad de que la metilación aberrante de su promotor favoreciera una menor sensibilidad a la droga. Sin embargo, en DLD-1 el promotor se encontraba hipermetilado en ambos alelos, dato que resulta novedoso en la bibliografía. Como veremos más adelante, DLD-1 es una

línea sensible al tratamiento con 5-FU. Los datos de RT-PCR cuantitativa demostraron expresión de la enzima TP tanto en líneas con la isla CpG del promotor hemimetilada como en DLD1, que presentaba metilación de las dos copias. Por tanto, parece que la metilación del promotor de *TP* no afecta decisivamente a su expresión.

En aquellos casos en que no aparecía metilada la isla del promotor de *TP*, tampoco se encontraba metilado el promotor de *MRP3* (χ^2 , $p=0.0302$). Aunque TP es la enzima de activación del 5-FU, su estado no metilado se asocia al de los genes de resistencia a droga. Empero *TP*, al igual que *p73*, desempeña el papel de factor angiogénico, por lo que su sobreexpresión tampoco suele asociarse con un buen pronóstico en pacientes de cáncer. El promotor de *p73* se encontró hemimetilado únicamente en SW48, y metilado en HL-60. Dado que *p73* es un gen supresor de tumores, puede que la metilación aberrante de uno de sus alelos tenga relación con la resistencia de SW48 a la droga.

Los genes reguladores del ciclo celular también mostraban un patrón de metilación significativo. *p16^{INK4a}* se encontró metilado en todas las líneas estudiadas, excepto en tres líneas de mama y pulmón, donde se encontró deleciónado.

La evaluación del estado de metilación de *DPYD* condujo hacia un resultado bastante sorprendente. SW48 presentaba hipermetilación aberrante del promotor de *DPYD*. Es posible que ésta, junto con el estado hemimetilado de *TYMS* y *TP*, sea la clave de la baja sensibilidad de esta línea a 5-FU. Puede que la célula, ante la incapacidad de metabolizar el 5-FU, lo expulse hacia el exterior. SW48 es una línea con alta tasa de metilación aberrante de los promotores analizados, por lo que parece una línea con bastante agresividad tumoral. Todo ello contribuye a la menor sensibilidad al tratamiento con 5-Fluorouracilo.

4.1.4.2. Análisis de las variantes genéticas en líneas celulares de cáncer humano de los genes del metabolismo de grupos metilo en los perfiles de metilación del ADN

SAM (S-Adenosilmetionina) es el donante universal de grupos metilo para todas las reacciones de metilación, incluida la metilación del ADN. La existencia de variantes genéticas en los genes implicados en el metabolismo de SAM podrían afectar a los patrones de metilación del ADN (Chen et al., 1996, Chen et al., 2001). Para determinar si la presencia de estas variantes en líneas celulares tiene algún efecto en los patrones de metilación de su ADN, se estudiaron cuatro alelos polimórficos conocidos de los genes del metabolismo de grupos metilo: *MTHFR* (Metilen-tetrahidrofolato Reductasa), *MS* (Metionina Sintetasa) y *CBS* (Cistationina- β -sintasa) en la colección de líneas celulares de cáncer humano del estudio (Esteller et al., 1997; Gulati et al., 1996; Shen et al., 2001). Las cuatro variantes de los polimorfismos analizadas son relativamente comunes en la población general. Estas variantes dan lugar a proteínas con menor actividad, como consecuencia, reducen la disponibilidad del

donante universal de grupos metilo SAM (Figura 8) (Houlston et al., 2001; Ma et al., 1999; Poirier et al., 1994; Stern et al., 2000).

El genotipado de cada alelo en particular o en combinación con otros alelos en diferentes haplotipos no reveló ninguna relación significativa con la hipermetilación de islas CpG ni con el contenido de 5-mC del ADN, como ya se había descrito con anterioridad (Paz et al., 2002)

4.1.5. Análisis de la citotoxicidad/viabilidad de las células tratadas con 5-Fluorouracilo y Oxaliplatino

Para determinar los posibles mecanismos de resistencia a 5-FU, primero se analizó el grado de citotoxicidad que producía la droga en las líneas celulares humanas establecidas para los diferentes tipos tumorales. Para ello, se trataron con diferentes concentraciones de 5-FU y oxaliplatino (descrito en materiales y métodos) las líneas celulares MCF-7, Hs578T, HCC1937, SW620, SW480, SW48, HCT-116, DLD1, CACO2, LoVo, HT29, A549, H441, HELA, SW756 y HL-60. A continuación se comprobó la citotoxicidad producida por cada fármaco solo o en combinación, mediante tinción de células apoptóticas con IP/Anexina V y posterior análisis por citometría de flujo, como se detalla en el apartado de Material y Métodos.

4.1.5.1. Ensayo de citotoxicidad de 5-FU en líneas celulares mediante tinción con IP/Anexina V y FACS

Los datos de citotoxicidad se obtuvieron al cabo de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con 5-FU y oxaliplatino, solos o en combinación.

El análisis de apoptosis se llevó a cabo por citometría de flujo en células teñidas con IP/Anexina-V. En líneas sensibles a 5-FU, se observó un gran incremento de muerte celular por apoptosis en la población de células tratadas con respecto a los controles sin tratar. Y este incremento se hacía más patente al aumentar la dosis de cada fármaco (Figura 23).

Parece que la muerte celular por apoptosis en líneas sensibles (SW480) se producía a dosis mínimas de 5-FU (5uM), mientras en líneas resistentes (SW620) eran necesarias dosis bastante elevadas (50uM) para apreciar la tinción de células apoptóticas.

Por otro lado, se observó una mayor tasa de necrosis dependiente de dosis en células resistentes que en las sensibles (Figura 23). Estos datos parecen indicar que la muerte celular en líneas sensibles a 5-FU se produce preferentemente por mecanismos apoptóticos, mientras que en líneas resistentes es debida, en mayor medida, a procesos necróticos.

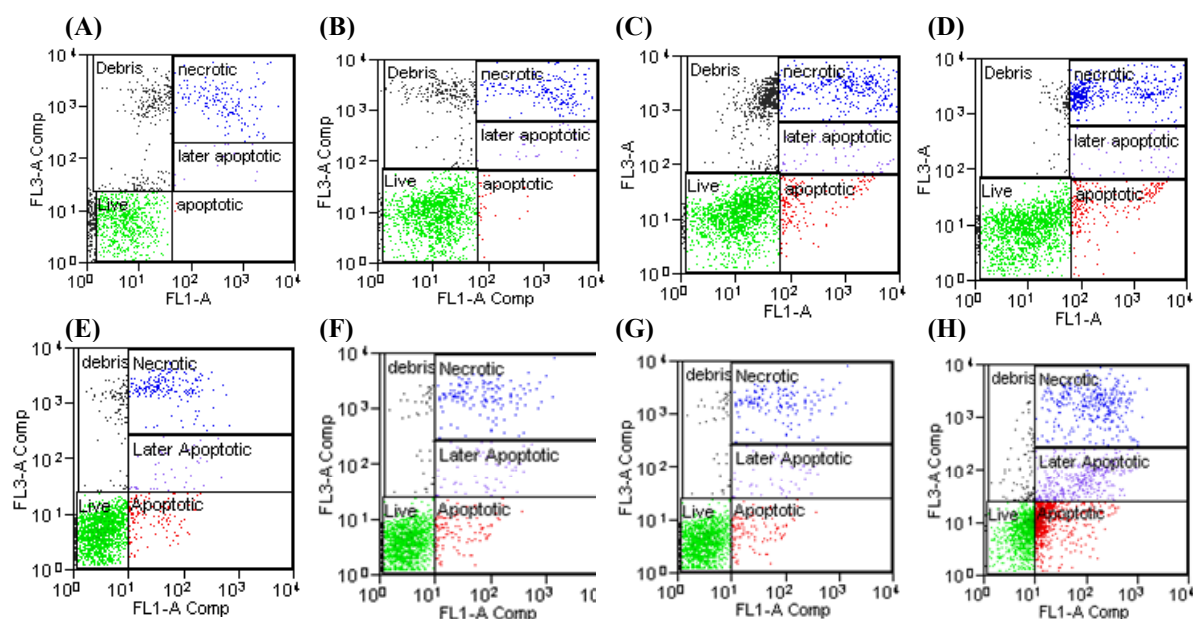


Figura 23: FACS: Células resistentes: SW620 (A-D) y sensibles: SW480 (E-H) a 5-FU, tratadas con diferentes dosis de 5-FU durante 72 horas: (A,E) control sin tratamiento, (B,F) 5uM, (C,G) 50uM, (D,H) 500uM. Se observa un incremento en la cantidad de células apoptóticas tanto en líneas sensibles (SW480) como resistentes (SW620) a 5-FU. No obstante, en líneas sensibles (E-H) comienzan a entrar en apoptosis a dosis mucho menores de 5-FU (5uM) que en el caso de las células resistentes (50uM). También se observa una mayor tasa de necrosis dependiente de dosis en las células resistentes en comparación con las sensibles.

Paralelamente, el análisis exhaustivo de las gráficas de citometría permitió establecer varios hechos llamativos. El primero de ellos era que algunas líneas de colon, tanto resistentes como sensibles a 5-FU, sufrían un aumento de tamaño con respecto al control sin droga cuando eran tratadas con dosis excesivas (Figura 24), es decir, cuando la dosis superaba la concentración de 100uM. Este aumento de tamaño podía suponer hasta un 50% en el caso de la línea SW480, y era algo menor en la línea SW620 (Figuras 23 y 24). Puesto que SW480 es bastante sensible al tratamiento con 5-FU, es posible que el aumento de tamaño se deba a una desregulación generalizada en el metabolismo celular. Es posible que se formen cuerpos apoptóticos que supongan un incremento en el tamaño de la célula. También puede existir un aumento del líquido intracelular citoplasmático como consecuencia de la desregulación metabólica para compensar el desequilibrio osmótico. Este último también incrementaría el tamaño celular.

El segundo de los efectos destacables fue un aumento en la complejidad celular de manera dependiente de dosis. La línea SW620, resistente al tratamiento según nuestros resultados, sufría este efecto tan llamativo como fruto de la administración de dosis de 50uM. Resulta muy interesante descubrir que la complejidad medida en esta línea tratada con 50uM de 5-FU doblaba la complejidad medida a dosis inferiores o en células sin tratar. Una vez superada la dosis de 50uM, la complejidad seguía aumentando pero no tan abruptamente (fig 23).

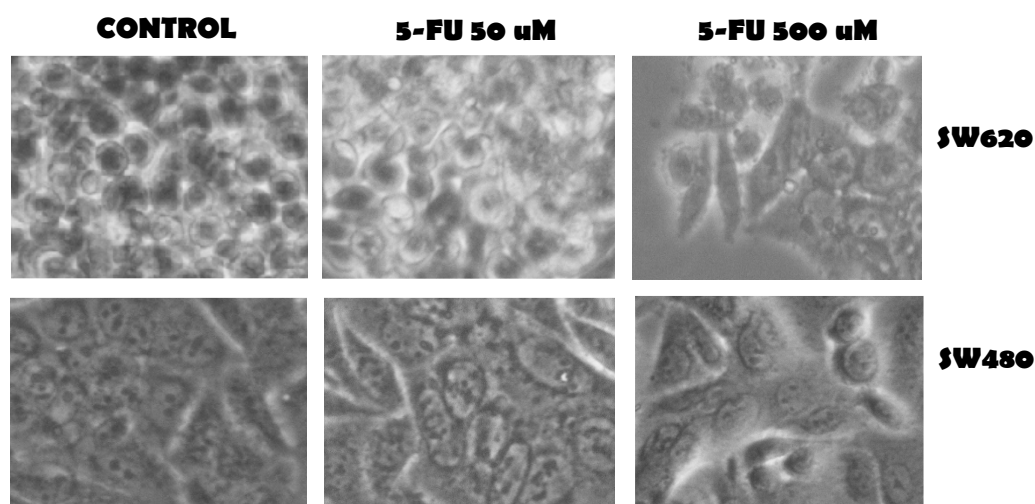


Figura 24: Imagen de microscopía óptica (40x): Cultivos celulares de líneas de colon resistentes (SW620) y sensibles (SW480) a 5-FU tras 72 horas de exposición a diferentes dosis de la droga (Control sin tratar, 50 uM y 500uM). Se observa un aumento de tamaño en ambas líneas, aunque es más notorio en la línea sensible SW480.

Merece la pena comentar que, eventualmente, el aumento de tamaño más pronunciado tuvo lugar en líneas sensibles (SW480), mientras que la complejidad aumentaba de forma más abrupta en líneas resistentes (SW620). Este dato apoyaría nuestra hipótesis de que el aumento de tamaño radica en la desorganización que tiene lugar en células sensibles. Esta desregulación de su metabolismo generaría acumulación de cuerpos apoptóticos, líquido intracelular citoplasmático y otras estructuras derivadas de la catástrofe celular.

Por otro lado, en líneas resistentes lo que tiene lugar en mayor medida es una ganancia en complejidad. Es posible que en la célula se activen mecanismos de defensa contra el agente nocivo y esto produzca una mayor complejidad en la estructura celular.

Los resultados indicaron que la dosis de 5-FU necesaria para conseguir la misma fracción de inhibición de crecimiento era superior líneas resistentes, como SW620, contrastado con líneas sensibles, como SW480 (IC50: 43 uM vs 2.2 uM respectivamente). Además, como se puede observar en la figura 23, parece que el mayor efecto de la droga se producía al cabo de 48 horas en líneas sensibles. Seguidamente, aumentaba la proporción de apoptóticas y se agravaba el efecto a las 72 horas. Mientras, en las líneas resistentes, aunque la frecuencia de células vivas disminuía ligeramente a las 48 horas de tratamiento, más tarde se observaba una recuperación de la viabilidad celular (Figura 25).

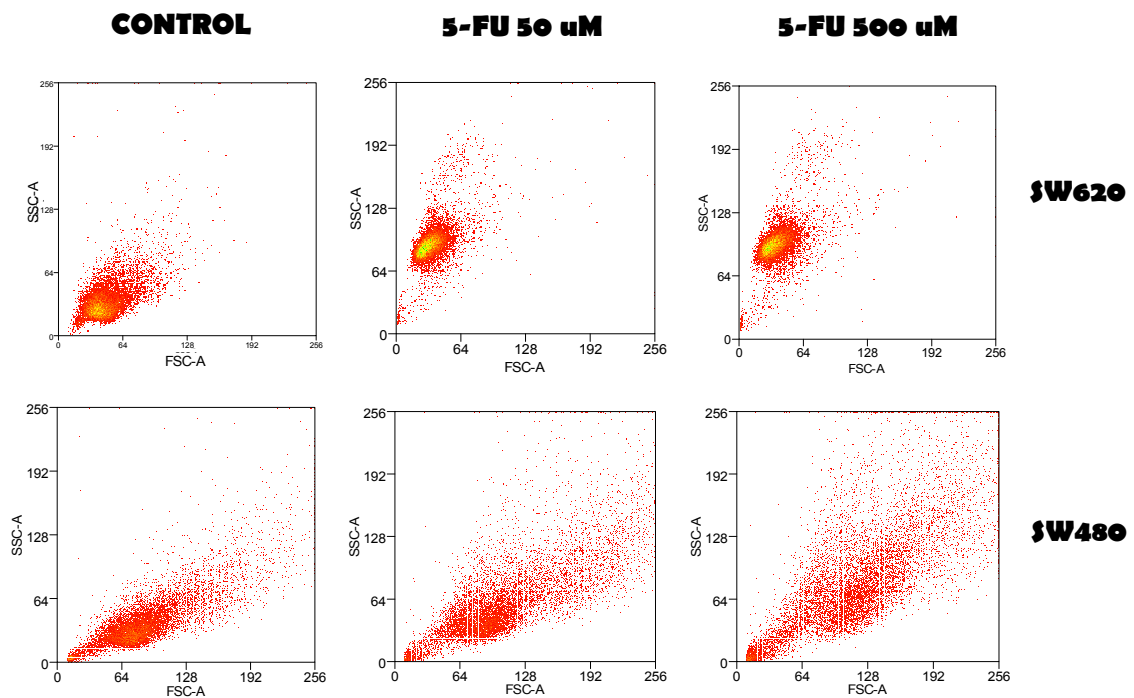


Figura 25: FACS de las líneas SW620 y SW480 tras teñir con IP-Anexina V a las 48 horas de exposición a altas dosis de 5-FU y control sin tratar. Se observa un aumento del tamaño (FSC, eje x) y complejidad (SSC, eje y) celular dosis-dependiente. Canal FL1 (Anexina V: tiñe células apoptóticas por unión a los lípidos presentes en la membrana celular que están en desintegración). Canal FL3 (Ioduro de Propidio: se incorpora a los ácidos nucleicos en células muertas o que están en proceso de muerte celular). El aumento de tamaño (FSC) es más notorio en células sensibles (SW480), mientras que la ganancia en complejidad (SSC) es más visible en células resistentes a 5-FU (SW620).

Si tenemos en cuenta la tasa de duplicación (Figura 26), el punto máximo de acción de la droga tiene lugar en la fase exponencial de crecimiento del cultivo. Este hecho se explicaría porque el 5-FU es un fármaco que actúa principalmente en fase S, que es cuando opera la Timidilato Sintasa, enzima responsable de la síntesis *de novo* de Timidina. El segundo modo de daño al ADN a través de 5-FU se basa en la incorporación errónea de nucleótidos, mecanismo que también tiene lugar durante la replicación en fase S.

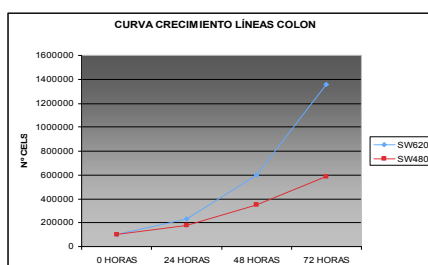


Figura 26: Curvas de crecimiento de las líneas de colon SW620 y SW480. Se observa que la fase exponencial empieza a partir de las 24 horas en cultivo.

Los datos indicaban que, a dosis muy elevadas de 5-FU, la frecuencia de células SW620 vivas no disminuía, mientras que en las SW480 disminuía al 30% y la frecuencia de apoptosis aumentaba hasta el 50% a las 72 horas de exposición (Figuras 27 y 28).

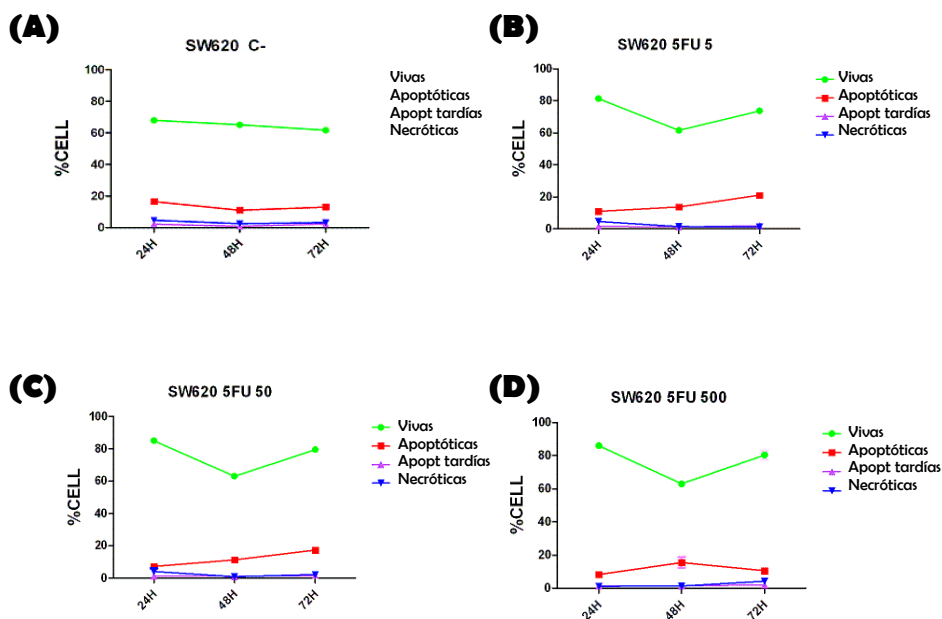


Figura 27: Viabilidad de la línea celular SW620, resistente a 5-FU, tratada con 5-FU a diferentes concentraciones: (A) control sin tratar, (B) 5uM, (C) 50uM, (D) 500 uM al cabo de 24, 48 y 72 horas de tratamiento. La exposición a dosis muy elevadas no parece afectar a la viabilidad celular en la línea SW620.

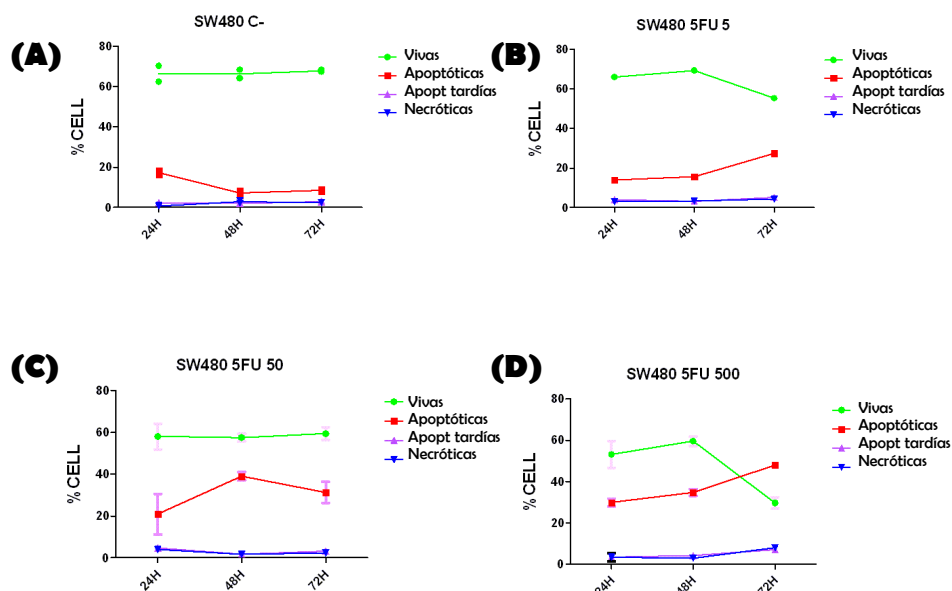


Figura 28: Viabilidad de la línea celular SW480, sensible a 5-FU, tratada con 5-FU a diferentes concentraciones: (A) control sin tratar, (B) 5uM, (C) 50uM, (D) 500 uM al cabo de 24, 48 y 72 horas de tratamiento. La exposición a dosis de 500uM de 5-FU reduce la frecuencia de células vivas a la mitad, y aumenta la frecuencia de células apoptóticas hasta un 50%.

4.1.4.2. Apoptosis producida por el tratamiento con 5-FU en líneas celulares de colon

Una vez comprobados los efectos citotóxicos del 5-FU en líneas celulares, quisimos corroborar los datos de apoptosis mediante un estudio de viabilidad celular con *TUNEL* (*terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick end-label*), en el que se tiñen los extremos de las hebras de ADN fragmentadas. La apoptosis produce fragmentación del ADN celular, y esta técnica tiñe con un nucleótido marcado de manera fluorescente, los extremos de cada fragmento de ADN. Con esta técnica pretendíamos dilucidar si la muerte celular producida por la droga se debe realmente a un mecanismo apoptótico o es un proceso necrótico. La hipótesis de partida radicaba en que el número de células apoptóticas crecía gradualmente a medida que se aumenta la dosis de 5-FU cuando se tratan líneas sensibles a la droga (Figura 30). Estos datos se confirmaron al realizar el t-test para la frecuencia de células apoptóticas tratadas con diferentes dosis de 5-FU; sólo se observaron diferencias significativas respecto al control sin tratar en la línea resistente SW620 a las 24 horas de tratamiento, pero no a las 48 ni 72 horas ($p=0.0081$ IC95 $-0.5375/-0.1153$; $p=0.2657$, IC95 $-0.3111 - 0.9624$; $p=0.2504$ IC95 $-0.1329 - 0.4325$ respectivamente).

En la línea celular SW480 sensible a 5-FU sí resultó que la cantidad de células apoptóticas aumentaba significativamente con la dosis de 5-FU tanto a las 24 horas como al cabo de 48 y 72 horas. Esta frecuencia se incrementaba de forma aún más significativa cuando se prolongaba el tiempo de exposición (24 horas: $p=0.0131$, IC95 $0.1580 - 0.9582$. 48 horas: $p=0.0175$, IC95 $0.7983 - 5.980$. 72 horas: $p=0.0033$, $1.267 - 4.279$) (Figuras 29 y 30).

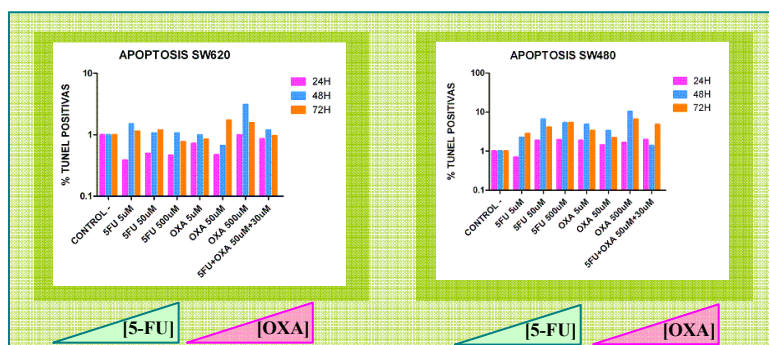


Figura 29: Porcentaje de células apoptóticas contabilizadas en la tinción con TUNEL. Odds ratio tomando como referencia el control sin tratar.

Parece, por tanto, que en células resistentes al tratamiento la muerte celular probablemente se debe a un proceso de necrosis, puesto que apenas se observan células apoptóticas, ni si quiera al tratar con 500uM de 5-FU. Estos datos apoyarían los observados en el estudio de *FACS* (apartado 3.2 de este capítulo de resultados). No obstante, no se

pueden descartar otros mecanismos de muerte celular no apoptótica como autofagia o catástrofe mitótica, puesto que no se han realizado las comprobaciones pertinentes.

Cuando se administró 5-FU combinado con oxaliplatino, se observó un mayor porcentaje de células apoptóticas, apreciándose un incremento con respecto a la exposición a 5-Fluorouracilo como agente único (Figura 31). Este efecto es debido a los depósitos de platino que producen roturas de doble hebra en el ADN.

Cabe destacar que el proceso de apoptosis en estas células es independiente de *p53*, puesto que tanto SW480 como SW620 tienen ausencia funcional de *p53* porque presentan mutaciones para este gen (Wadler et al., 1998).

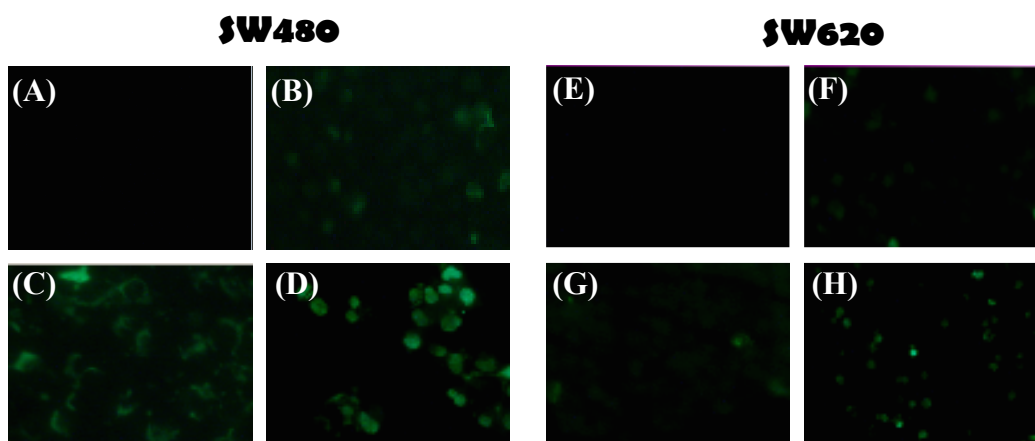


Figura 30: TUNEL. Células sensibles (SW480) y resistentes (SW620) a 5-FU, tratadas con diferentes dosis de 5-FU durante 72 horas: control sin tto (**A,E**), 5uM (**B,F**), 50uM (**C,G**), 500uM (**D,H**).

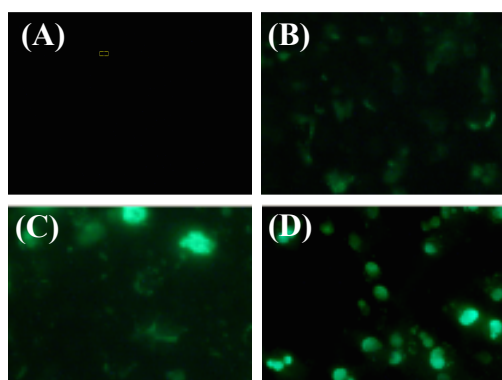


Figura 31: TUNEL. Células sensibles (SW480) a 5-FU, tratadas con diferentes combinaciones de 5-FU/oxaliplatino durante 72 horas: control sin tto (**A**), 5uM/3uM (**B**), 50uM/3uM (**C**), 500uM/3uM (**D**). Se observa mayor cantidad de células apoptóticas que cuando se trataron con 5-FU como agente único (comparar con figura 30).

4.1.6. Patrón de ciclo celular en líneas celulares tras la exposición a 5-Fluorouracilo y Oxaliplatino

Los tratamientos con agentes antimetabolito producen un desequilibrio en el reservorio de nucleótidos de la célula. Este desequilibrio de nucleótidos provoca una parada en fase G1 mediada por *p53*. El fin de esta parada es evitar la apoptosis que se producirá en fase S por

incorporación errónea de nucleótidos durante la síntesis del ADN. Es decir, la parada del ciclo celular en fase G1 mediante la acción de *p53* es un mecanismo protector mediante el cual la célula evita la entrada en fase de síntesis (Kastan et al., 1991).

Sin embargo, no todas las células malignas expresan *p53*, ya que muchas de ellas lo tienen mutado, por lo que decidimos averiguar si estas células perdían la habilidad para pararse en G1 igual que entraban en apoptosis mediante un *check-point* independiente de *p53*.

Las células tratadas con diferentes dosis de 5-FU y oxaliplatino, solos o en combinación, se levantaron al cabo de 24, 48 y 72 horas con el fin de determinar cuál era el patrón de ciclo celular que se asociaba al tratamiento. Pretendíamos dilucidar si este patrón era distinto del que tenían los correspondientes controles sin tratar.

Tal y como muestran las figuras 32 y 33, el porcentaje de población celular para la línea SW620 en fase G1, S y G2/M del ciclo variaba con los diferentes tratamientos (Tabla 10). Tras 24 horas de tratamiento con 5-FU, se observaba una tendencia a acumularse en fase G1 en comparación con las no tratadas. Esta acumulación se hacía más patente al aumentar la concentración del fármaco (Wilcoxon test, $p=0.0142$), como ya habían apuntado Wadler y colaboradores. Por el contrario, no se observaron diferencias al tratar con oxaliplatino, por lo que la acumulación en G1 parecía ser un efecto debido al 5-FU. Cuando se administraron ambos agentes a la vez, parecía existir una sinergia entre ambos que no producía parada en el límite G1/S, sino acumulación en la fase S del ciclo. Es decir, añadir oxaliplatino era un efecto beneficioso con respecto al tratamiento con 5-FU solo porque aumentaba la sensibilidad del cultivo. Puesto que el 5-FU actúa en la fase S del ciclo celular, la parada en G1, anterior a S, evita que la droga pueda actuar. La adición de oxaliplatino al medio provoca que las células continúen su ciclo normal y el 5-FU puede actuar sobre ellas una vez que entran en fase de síntesis. Estos datos eran coherentes con los resultados de citotoxicidad, en los que se observaba un aumento del proceso apoptótico al tratar con ambos agentes simultáneamente. Parece que la acción del oxaliplatino como inhibidor de la parada en G1 favorece la acción del 5-FU, quien provoca la muerte celular por apoptosis. También apoya los datos publicados por Boyer y colaboradores (2004), quienes indicaban que las líneas celulares *p53* mutantes, paraban el ciclo celular en fase S, mientras que las *p53 wild type* paraban en G2/M. En nuestros análisis sobre la línea SW620, que es *p53* mutante, la parada tenía lugar en fase S. En cambio, las líneas sensibles a 5-FU con *p53* silvestre, como HCT-116, paraban en fase en G2/M, como veremos más adelante.

Después de la exposición a 5-FU se observó que aparecía en las líneas celulares resistentes (SW620), un retraso del ciclo celular con una detención en el límite de la fase G1/S (Figura 32). Según el test de Kruskal-Wallis, la acumulación en G1 variaba significativamente entre 24, 48 y 72 horas (p valor < 0.0001) (Figura 34).

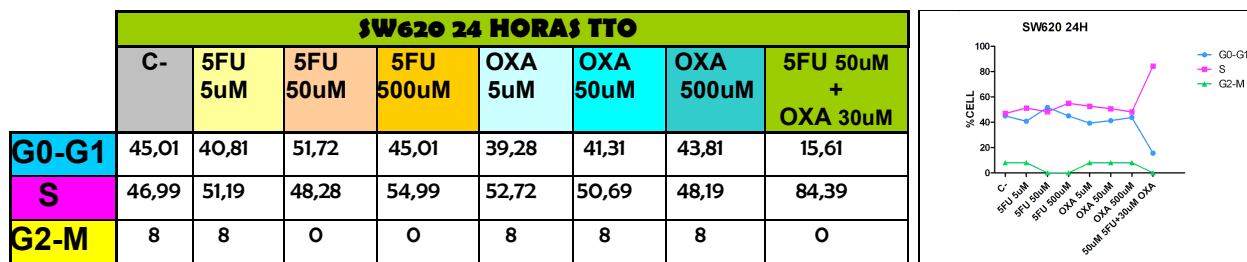
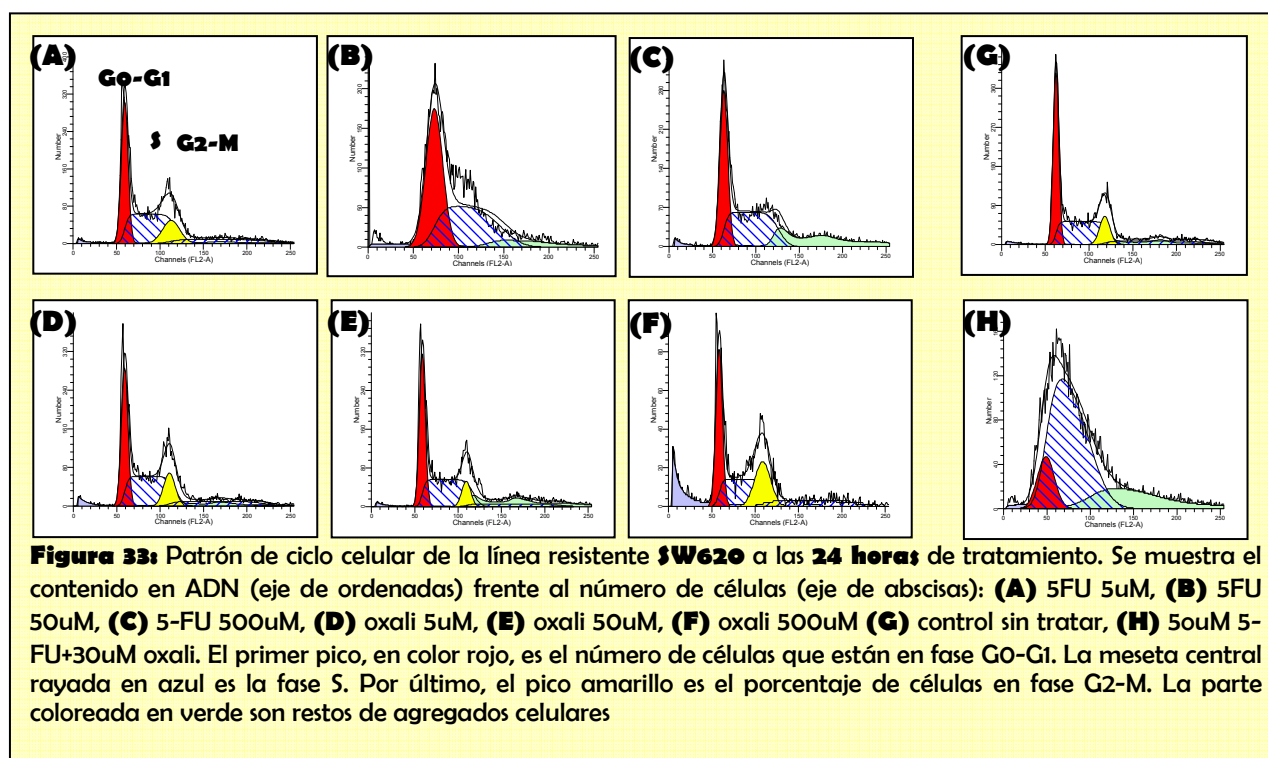


Tabla 10 y Figura 32: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras 24 horas de tratamiento con distintas concentraciones de 5-FU y oxaliplatino. Existe un efecto potencialmente sinérgico de acumulación en fase S al tratar con 5FU+oxaliplatino. G0, G1, G2 y M: fases del ciclo celular. TTO: tratamiento.



En la línea resistente a 5-FU (SW620) se observó un dato llamativo al cabo de 48 horas, la proporción de células que estaban en fase G1 cuando eran tratadas con dosis inferiores a 50uM de 5-FU o con 50uM durante 24 horas, pasaban a acumularse en fase S. Pero si la dosis o el tiempo de exposición eran superiores, este efecto no se observaba, es decir, seguían estando en fase G1 (Figura 34A) (Tabla 12 y figura 37). Este punto de inflexión coincidía con un pico de expresión de ARNm de DPD cuando se analizó por qRT-PCR (Figura 34B). Puesto que DPD es la enzima que cataboliza el 5-FU, es posible que su sobreexpresión sea causa o efecto de este avance en el ciclo celular. El exceso de droga podría inducir la sobreexpresión de la enzima que ha de eliminarlo o, por el contrario, la sobreexpresión de la enzima permite catabolizar el 5-FU y favorece la progresión normal del ciclo celular. De hecho, al cabo de 72 horas de exposición, se observaba que la cantidad de DPD era muy superior en células

tratadas con altas dosis de 5-FU respecto a las no tratadas o expuestas a dosis muy bajas (Figura 34 B).

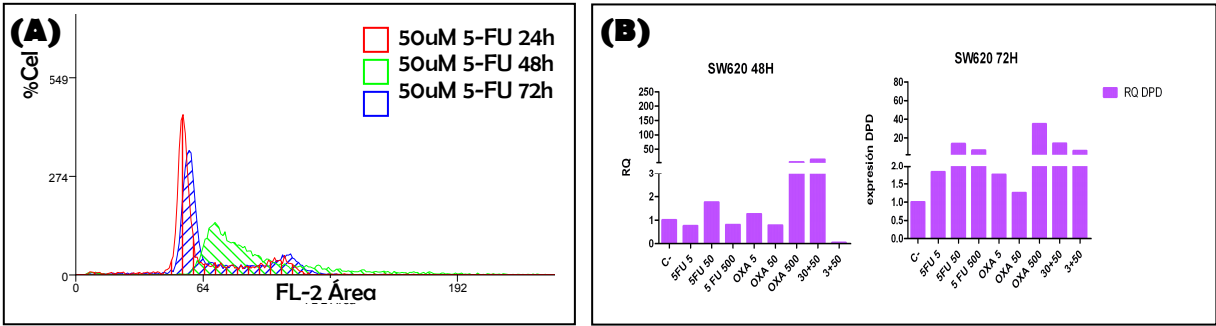


Figura 34: (A) Ciclo celular SW620 tratadas con 50uM de 5-FU durante 24, 48 y 72 horas. A las 48 horas de exposición, se observa una progresión a la fase S de aquellas células que permanecían detenidas en G1 cuando se trataron durante menos tiempo o a dosis de 5-Fu inferiores a 50uM. (B) qRT-PCR de DPD (enzima que cataboliza el 5-FU) de SW620 después de 48h y 72h de exposición a distintas dosis de 5-FU. Se observa un pico de expresión de DPD al cabo de 48 horas de exposición a 50uM de 5-FU. Esta diferencia no se observa a las 72 horas ni en el caso de la exposición durante 48 horas a 500uM.

SW620 48 HORAS TTO							
	C-	5FU 5uM	5FU 50uM	5FU 500uM	OXA 5uM	OXA 50uM	OXA 500uM
G0-G1	49,01	46,76	8,01	53,52	45,26	34,72	33,85
S	42,99	45,24	74,58	46,48	53,76	52,72	59,73
G2-M	8	8	17,41	0	0,97	12,56	6,42

	5FU 50uM + OXA 30uM
G0-G1	25,42
S	64,48
G2-M	10,11

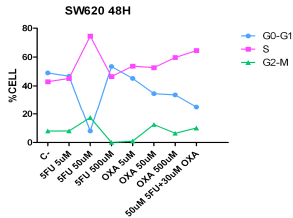


Tabla 11 y Figura 35: Porcentaje de células SW620 en las diferentes fases del ciclo celular tras 48 horas de tratamiento con distintas concentraciones de 5-FU y oxaliplatino. G0, G1, G2 y M: fases del ciclo celular. TTO: tratamiento. Se observa un punto de inflexión en las células expuestas a 50uM de 5-FU. En este punto, la frecuencia de células en G0-G1 se intercambia con la frecuencia de células en fase S, de manera que la primera disminuye súbitamente con respecto al resto de tratamientos, mientras que la segunda aumenta.

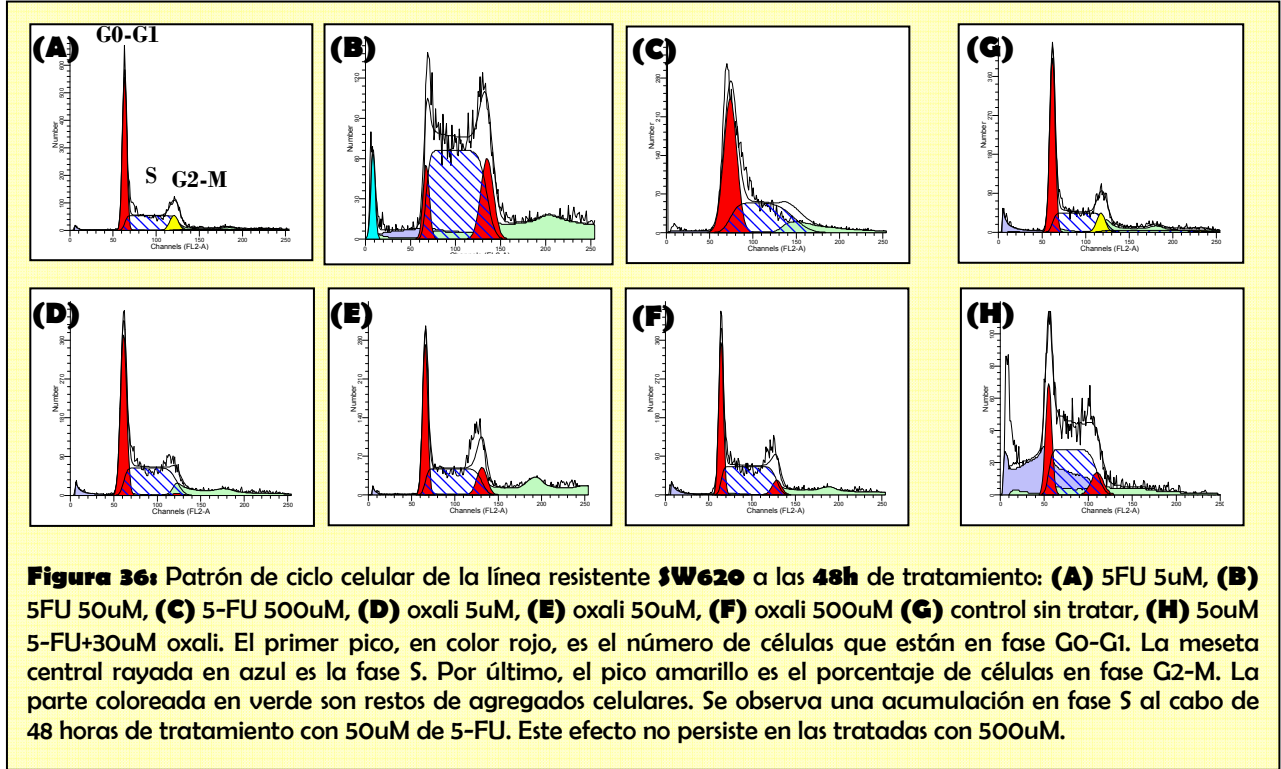


Figura 36: Patrón de ciclo celular de la línea resistente SW620 a las 48h de tratamiento: (A) 5FU 5uM, (B) 5FU 50uM, (C) 5-FU 500uM, (D) oxali 5uM, (E) oxali 50uM, (F) oxali 500uM (G) control sin tratar, (H) 50uM 5-FU+30uM oxali. El primer pico, en color rojo, es el número de células que están en fase G0-G1. La meseta central rayada en azul es la fase S. Por último, el pico amarillo es el porcentaje de células en fase G2-M. La parte coloreada en verde son restos de agregados celulares. Se observa una acumulación en fase S al cabo de 48 horas de tratamiento con 50uM de 5-FU. Este efecto no persiste en las tratadas con 500uM.

Al cabo de 72 horas de exposición a 500uM de 5-FU, prácticamente todas las líneas que analizamos perdían por completo su patrón de ciclo celular (Figura 38). Esto ocurría independientemente del estado de *p53* y de la sensibilidad de las células al tratamiento. Una dosis tan elevada de 5-FU produce un gran efecto citotóxico incluso en las líneas menos sensibles. Probablemente conlleva una desregulación de todo el metabolismo de la célula, incluidos los genes que participan en el ciclo celular.

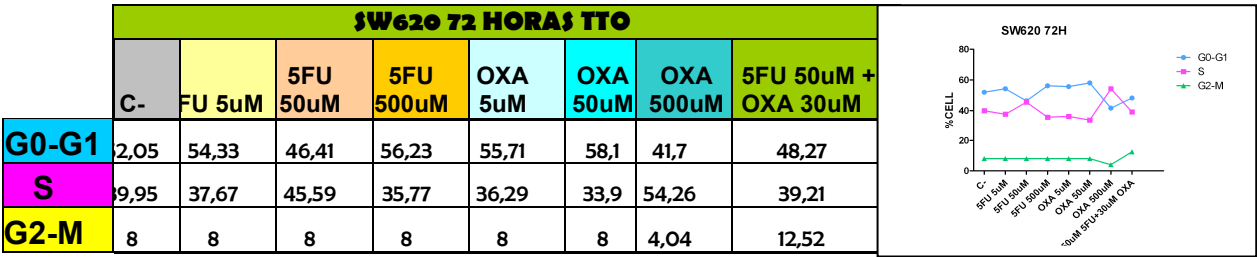
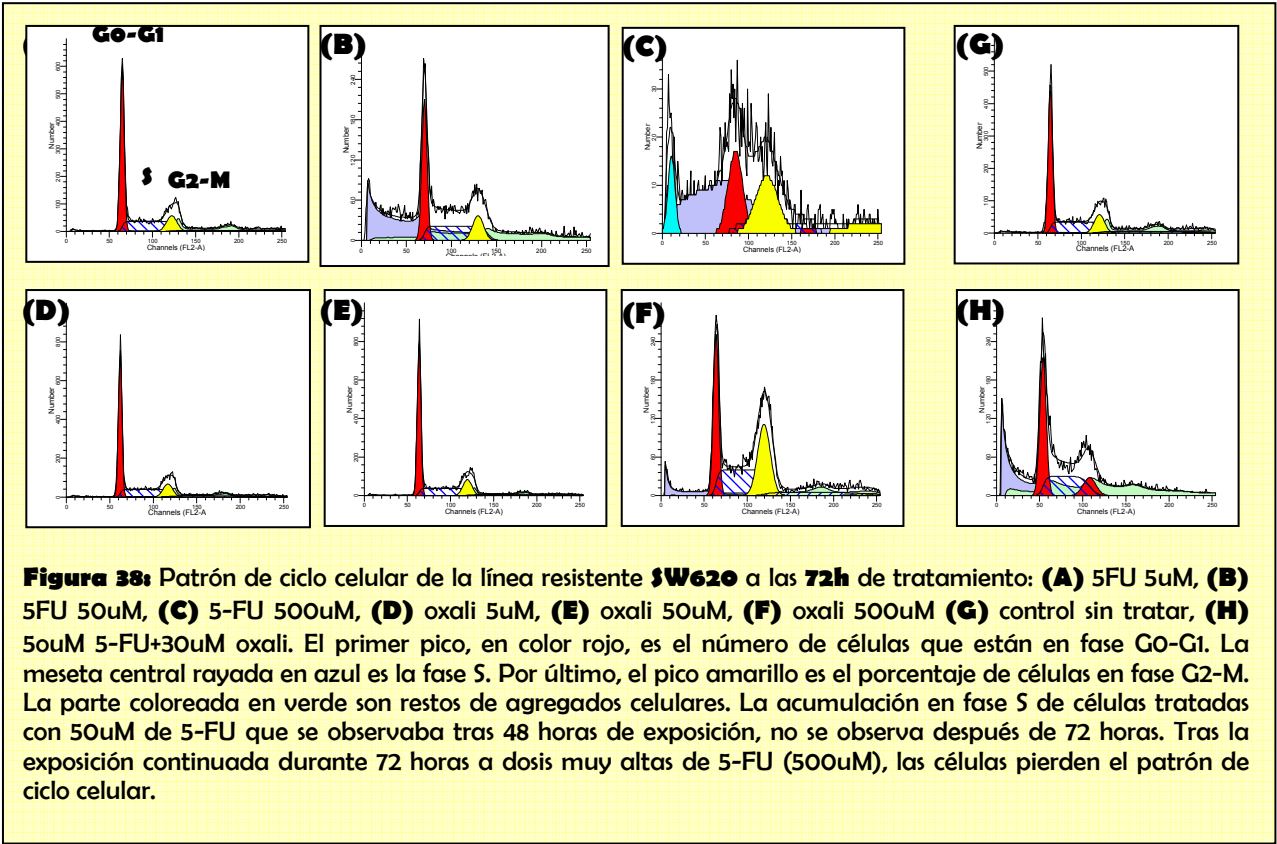
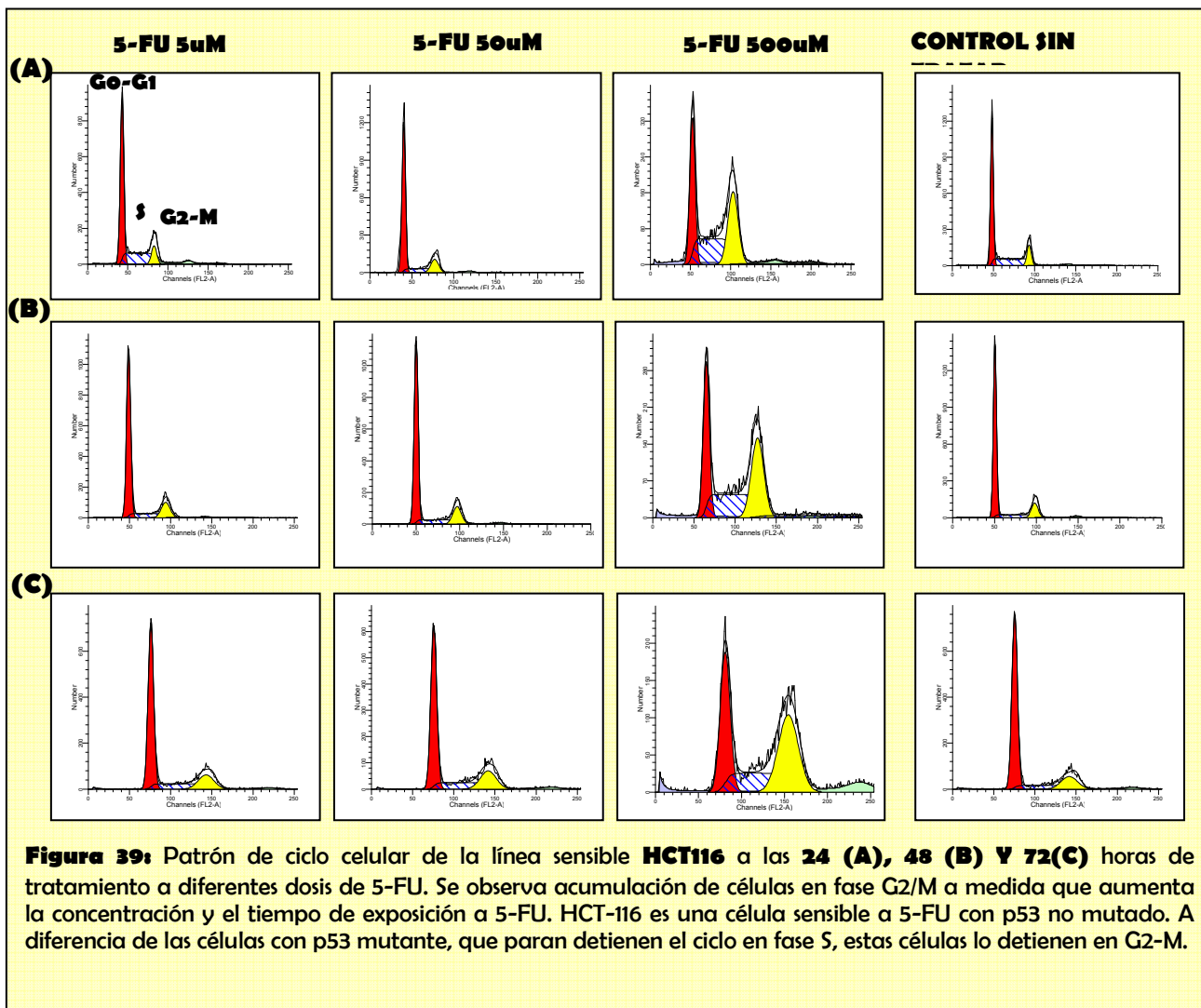


Tabla 12 y Figura 37: Porcentaje de células SW620 en las diferentes fases del ciclo celular tras 72 horas de tratamiento con distintas concentraciones de 5-FU y oxaliplatino. G0, G1, G2 y M: fases del ciclo celular. TTO: tratamiento. Al cabo de 72 horas, el porcentaje de células en fase G0-G1 y fase S es prácticamente idéntico. Por tanto, el efecto que se observaba tras 48 horas de exposición, parece revertir al prolongar el tiempo o la concentración de la droga.



Por otro lado, en líneas sensibles, se observaba un incremento dependiente de dosis de células en fase G2-M tratadas con 5-FU (Figura 39). Estos resultados encajaban con

experimentos publicados anteriormente llevados a cabo mediante la técnica de incorporación de BrdU, en que las células sensibles a 5-FU atravesaban el límite fase G1 tardía-S temprana (Mirjolet et al., 2002). Estos datos corroboran aquellos, al demostrar que la entrada en fase S no se debía a la utilización del BrdU como análogo de timina, como se había postulado.



4.1.5.1. Variaciones en la ploidía celular en líneas celulares expuestas a 5-Fluorouracilo/Oxaliplatino

Por otro lado, se observó que las líneas aneuploides tratadas con 5-FU, perdían la frecuencia de aneuploidías conforme aumentaba la dosis de la droga, de manera que a 500uM toda la población era diploide (Figura 40). Cuando los cultivos de SW480 se exponían a dosis de 5 y 50uM de 5-FU, se observa una población tetraploide, cuya fase G1 coincide con la fase G2 de la población diploide. En cambio, cuando la dosis de 5-FU se aumentaba hasta 500uM, la población tetraploide desaparecía. En su lugar, se observaban gran cantidad de

agregados. Hasta el momento, no teníamos constancia de este fenómeno en la bibliografía, quizás porque las dosis de 5-FU administradas o el tiempo de exposición suelen ser menores.

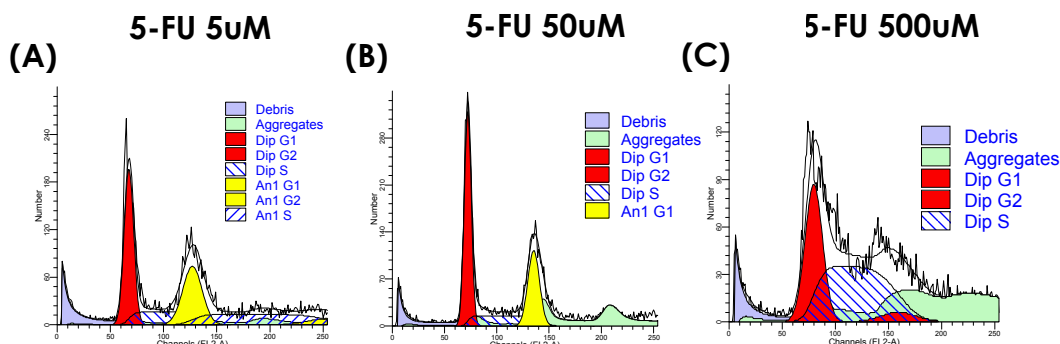


Figura 40: Ciclo celular (FACS) de SW480 tras 24 horas de exposición a 5uM **(A)**, 50uM **(B)** o 500uM de 5-FU **(C)**. El primer pico rojo es la fase G1 de la población diploide. La meseta rayada en azul es la fase S de la población diploide. El pico amarillo de las gráficas A y B es la fase G1 de la población aneuploide (en este caso, tetraploide) que coincide con la fase G2 de la población diploide (la cantidad de ADN es exactamente el doble: 4n). En cambio, en la gráfica C (SW480 tratadas con 500uM de 5-FU durante 24 horas), la subpoblación aneuploide no se detecta. Se observa un aumento en la cantidad de agregados (verde) a medida que se sube la dosis de 5-FU.

Este hallazgo se confirmó de forma similar en líneas celulares sensibles, como SW480, y en líneas resistentes a 5-FU, como SW620 (Figura 41). Al mismo tiempo, se observó un aumento de formación de agregados (coloreado en verde en las figuras 40 y 41). Estos agregados se formaban en cantidades proporcionales a la dosis administrada. Es decir, cuanto mayor era la concentración de la droga, más agregados mostraban los cultivos. Este dato parece apoyar la teoría de la alteración de la homeostasis celular por el 5-FU. Es posible que se activen mecanismos de adherencia.

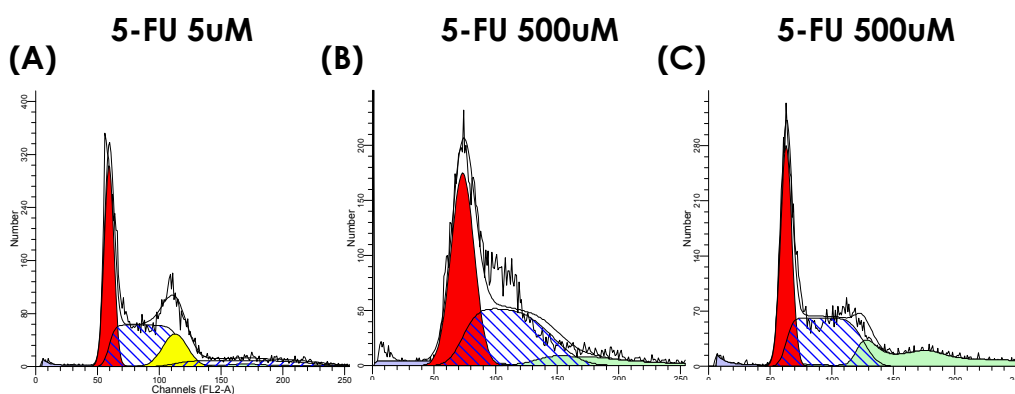


Figura 41: Ciclo celular (FACS) de SW620 tras 24 horas de exposición a **(A)** 5uM, **(B)** 50uM o **(C)** 500uM de 5-FU. El primer pico rojo es la fase G1 de la población diploide. La meseta rayada en azul es la fase S de la población diploide. El pico amarillo de la gráfica A es la fase G1 de la población aneuploide (en este caso, tetraploide) que coincide con la fase G2 de la población diploide (la cantidad de ADN es exactamente el doble: 4n). En cambio, en las gráficas B y C (SW620 tratadas con 50uM y 500uM de 5-FU respectivamente durante 24 horas), la subpoblación aneuploide no se detecta. Se observa un aumento en la cantidad de agregados (verde) a medida que se incrementa la dosis de 5-FU.

En la línea celular resistente a 5-FU SW620, se observó que el porcentaje de células en fase G2 era imperceptible a medida que se aumentaba la dosis de 5-FU. Esta desaparición del pico G2 era sustituida por un aumento del área de los otros dos (fase G1 y S). Este dato parece apoyar la hipótesis de que la acción del 5-FU como agente que se incorpora en el ADN, produce una mayor citotoxicidad en aquellas células con mayor cantidad de ADN, es decir, las que están en fase G2 y las tetraploides, cuya dosis de ADN es el doble que en las diploides.

4.1.6. Análisis de la expresión de ARNm en células tratadas con 5-FU/oxaliplatino por RT-PCR cuantitativa

Los niveles celulares de ARNm vienen determinados por un conjunto de circunstancias entre las que se encuentran las variantes polimórficas presentes en el gen correspondiente, así como el estado de metilación de su promotor o delección del gen (Liu et al., 2005, Crawford DC., 2005; Crawford DC., 2005-b, Brandeis et al., 1994, Klein et al., 1991. Macleod et al., 1984). Por tanto, decidimos analizar algunos genes cuyo nivel de expresión resulta decisivo para la respuesta a quimioterapia basada en 5-FU (*TYMS*, *TP*, *DPYD*, *MTHFR*, *p53*, *E2F1* y *RFC*). Entre estos genes, contábamos con *TYMS*, diana principal de acción del 5-FU; *TP* y *DPYD*, que son enzimas responsables del metabolismo de 5-FU. Por otro lado, *MTHFR*, enzima que juega un papel primordial en la ruta metabólica del ácido fólico y que está conectada con la ruta metabólica de 5-FU a través de la Timidilato Sintasa. Asimismo analizamos la expresión de *RFC*, transportador de folato reducido. Ante las variaciones estudiadas en el patrón de ciclo celular de líneas tratadas con 5-FU, también era interesante analizar *p53*. *p53* es un gen supresor de tumores, cuya acción es fundamental en la correcta progresión del ciclo celular, y en caso contrario, activa los mecanismos de apoptosis celular. Finalmente, estudiamos la expresión de *E2F1*, modulador de diversas funciones celulares tales como mitosis y apoptosis y que también puede actuar como oncogén. Este gen tiene un papel esencial en la regulación de la expresión de proteínas cuya acción es clave en la fase S del ciclo celular, entre ellas, TS.

Se recogieron muestras de líneas celulares sensibles (SW480, MCF-7, A549, HCT116, DLD1, HT-29) y resistentes (SW620 y SW48) a 5-FU en diferentes tiempos y dosis de exposición a 5-FU/oxaliplatino, solos o en combinación, tomando siempre como control una muestra sin tratar de cada línea. En este ensayo también se analizó el ARNm obtenido de *pellets* de líneas celulares 72 horas después de retirar el tratamiento y poner medio fresco, con el fin de determinar si las células eran capaces de recuperarse. El análisis de expresión a nivel de ARNm se llevó a cabo mediante qRT-PCR como se detalla en materiales y métodos.

Posteriormente, se procedió a analizar la expresión de proteína de los dos genes clave en la respuesta a 5-FU: *TYMS* y *p53*, mediante Western Blot e Inmunocitoquímica. La

finalidad principal de este análisis radicaba en la sospecha de que no existiera correspondencia entre los niveles de ARNm y proteína presentes en la célula.

4.1.6.1. Análisis de la expresión de ARNm in vitro mediante qRT-PCR

4.1.6.1.1 Relación entre la expresión de ARNm y proteína TYMS en líneas celulares

Durante años, se ha estudiado la expresión del gen *TYMS* como factor pronóstico de resistencia a 5-FU en diferentes tipos de tumores (Johnston et al., 1995; Johnston et al., 2003). No obstante, parece que en tumores humanos, la cantidad de proteína TS no siempre se correlaciona con los niveles de ARNm presentes en las células. Por esta razón, efectuamos una primera comprobación en las 17 líneas de estudio, midiendo el ARNm y la expresión de proteína, y posteriormente se analizaron mediante el test de regresión lineal, donde se obtuvieron datos de correlación positiva ($r^2=0.4585$, $P=0.0010$) (Figura 42). Por lo que, en principio, la cantidad de proteína basal se corresponde con los niveles de ARNm en líneas celulares tumorales.

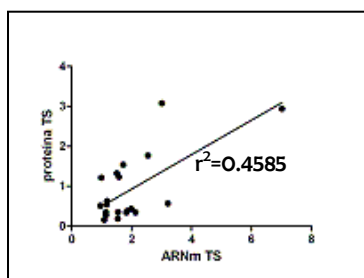


Figura 42: Regresión lineal entre niveles de proteína y ARNm de *TYMS*. Parece que sí existe correlación entre los niveles de proteína y ARNm de *TYMS* en humanos

4.6.1.2. Polimorfismos asociados con la expresión de ARNm en líneas celulares tratadas con 5-FU/oxaliplatino

Uno de los objetivos de este experimento consistía en determinar el comportamiento en respuesta al tratamiento de las líneas celulares expuestas a diferentes dosis de 5-FU/oxaliplatino. Para ello, existía la necesidad de determinar si la expresión de ARNm de los genes implicados en el metabolismo del 5-FU variaba de modo dependiente de dosis. Asimismo, se estimó si esta variación era distinta en células con diferentes genotipos para los polimorfismos en estos genes.

a) Variación en los niveles de ARNm de *TYMS* según el tiempo de exposición a la droga en presencia o ausencia del alelo 3G

Después de las primeras 24 horas con el tratamiento, no se observaban, en general, diferencias significativas en cuanto a expresión de ARNm de *TYMS* en líneas con y sin el alelo 3G. El patrón global de expresión indicaba una disminución gradual de los niveles de ARNm a medida que se aumentaba la concentración de 5-Fluorouracilo en el medio de cultivo. En líneas muy sensibles a 5-FU, como SW480, los niveles de *TYMS* se reducían casi a la mitad al tratar con una concentración de 5uM con respecto al control sin tratar (Figura 43A). No obstante, no se consideró significativo puesto que las líneas tratadas con oxaliplatino también tenían la expresión de ARNm de *TYMS* muy reducida. En la línea más resistente a 5-FU, SW620, se observó el efecto contrario, sobre todo al tratar con 500uM de 5-FU, la expresión de *TYMS* era 1.5 veces superior a la del control negativo (Figura 43B).

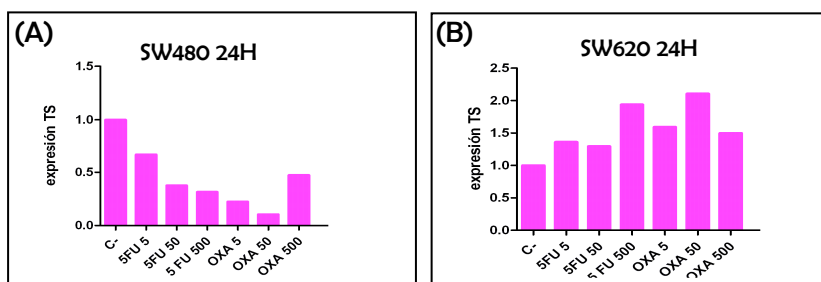


Figura 43: **(A)** Expresión de ARNm de *TYMS* en la línea SW480 sensible a 5-FU: se observa una reducción dosis-dependiente. **(B)** Expresión de ARNm de *TYMS* en la línea SW620 resistente a 5-FU, se observa un aumento sobre todo a dosis muy elevadas de la droga.

A las 48 y 72 horas de tratamiento, ya se observaron diferencias de expresión muy significativas, en general se producía una disminución de la expresión en líneas sensibles a 5-FU. Sin embargo, la línea resistente SW-48 tras 72 horas de exposición mostraba un nivel de expresión prácticamente igual que el control sin tratar, y después de 72 horas más sin tratamiento la expresión era aún mayor que el control. Este incremento se producía de manera dependiente de dosis (Figura 44), por lo que es posible que en líneas resistentes las dosis altas induzcan la expresión de *TYMS* en aquellas líneas portadoras del alelo 3G. En términos generales, no se encontraron diferencias de expresión entre líneas celulares con el alelo 3G y las que no lo tenían a ninguna dosis o tiempo de exposición a 5-FU. Aunque cabe destacar que la única línea portadora del alelo 3G de nuestro panel de líneas celulares establecidas empleadas para este estudio, SW48, tiene el promotor de *TYMS* hemimetilado, con lo que podría tener parcialmente silenciada su expresión. No obstante, no se han realizado experimentos de desmetilación inducida por drogas inhibidoras como 5-aza-

desoxicitidina para recuperar los niveles basales de expresión que corresponderían al promotor no metilado. Sería necesario ampliar el estudio e incluir un mayor número de líneas celulares portadoras del alelo 3G para ver si existen diferencias de expresión de ARNm de *TYMS* al tratar con 5-FU.

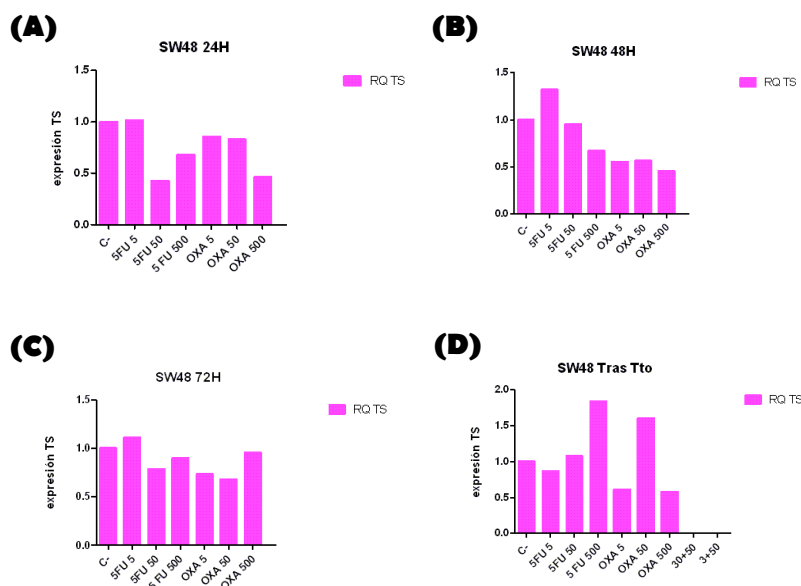


Figura 44: Expresión de ARNm de *TYMS* en la línea SW48 resistente a 5-FU a las 24 h **(A)**, 48h **(B)**, 72 h **(C)** de tratamiento y después de 72 horas de haber retirado el tratamiento **(D)**, donde se observa un aumento de la expresión, sobre todo en las que fueron tratadas con una dosis muy elevada de la droga.

b) Variación en los niveles de ARNm de MTHFR según el tiempo de exposición a la droga en presencia o ausencia del alelo 677T

Los niveles de ARNm de *MTHFR* en líneas celulares de genotipo silvestre 677CC disminuían, con respecto al control sin tratar, al acrecentar la dosis de 5-FU durante las primeras 48 horas (Fig 45).

Sin embargo, en estas mismas líneas de genotipo 677CC, los niveles de ARNm de *MTHFR* aumentaban cuando la dosis aplicada era de 500uM durante 72 horas. Este último efecto revertía en las células tratadas con 500uM de 5-FU 72 horas después de haberles retirado la droga del medio y la misma reversión se observaba en las que habían sido tratadas con 500uM de oxaliplatino (Figura 45).

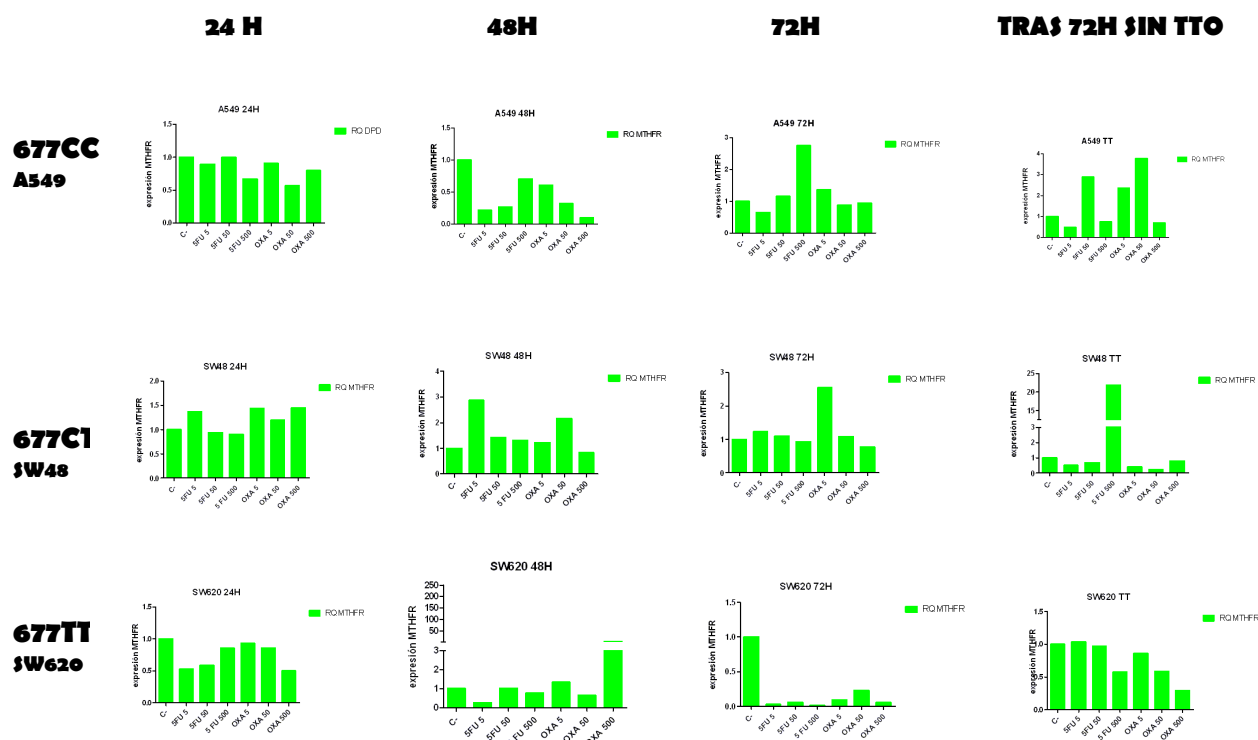


Figura 45: Niveles de ARNm de *MTHFR* en líneas celulares de los diferentes genotipos para el polimorfismo C677T tratadas con 5FU y oxaliplatino a 24, 48, 72 horas y 72 horas más sin tratamiento.

En el caso de dosis excesivas tanto de 5-FU como de oxaliplatino, es posible que todos los mecanismos celulares estén alterados y no se exprese ARNm porque las células se encuentran en el inicio de la apoptosis. Esta hipótesis se apoya en los resultados de citotoxicidad de líneas *MTHFR* 677CC (*wild type*), donde se observa precisamente una inversión entre los porcentajes de células vivas y apoptóticas al tratar con 500uM de 5-FU a partir de las 48 horas (Figura 46).

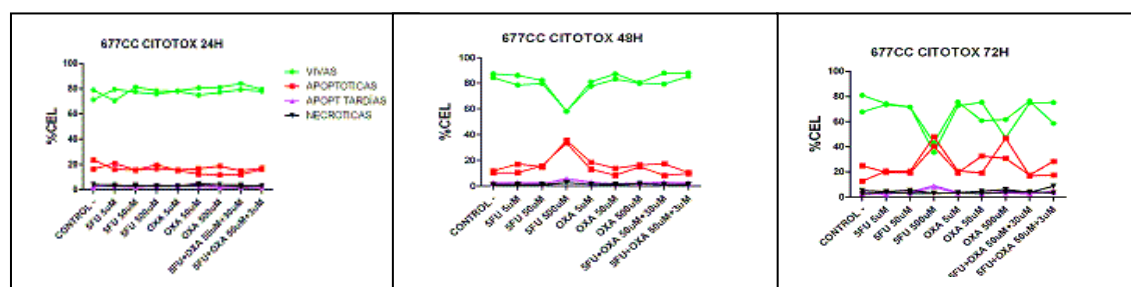


Figura 46: Combinación de los datos obtenidos por citometría de flujo de líneas *MTHFR*-677CC (A549, Caco2, Lovo, SW756 y DLD1) con IP/Anexina V. Porcentaje de células apoptóticas aumenta a las 48 horas de exposición a 500uM de 5-FU. Se observa una inversión entre los porcentajes de células vivas y apoptóticas en el cultivo expuesto a 500uM de 5-FU al cabo de 48 horas de exposición. Esta inversión es más acusada al cabo de 72 horas de exposición y se observa el mismo efecto en las células tratadas con 500uM de oxaliplatino.

En las líneas de genotipo homocigoto mutante 677TT los niveles de ARNm de *MTHFR* también disminuían con el aumento de la dosis y tiempo de exposición a 5-FU. Sin embargo, tras retirar la droga se recuperaban, aunque no presentaban niveles de ARNm superiores al control sin tratar (Figura 46). Este resultado parece apoyar la hipótesis propuesta para homocigotos normales 677CC. En el caso de los homocigotos 677TT, el polimorfismo promueve una menor actividad enzimática. Por tanto, la célula en estado normal acumularía el sustrato de MTHFR (5,10-MTHF). Este sustrato sería utilizado por el 5-FU como cofactor en la inhibición de TS. Una vez retirado el 5-FU del medio, los niveles de ARNm de *MTHFR* no se incrementan porque el metabolismo de la célula vuelve a su estado normal, y no tiene carencias de folato que pudiesen inducir la expresión de la enzima porque el medio de cultivo es rico en nutrientes. Por otro lado, se trata de una reacción limitante y también reversible en esta ruta metabólica. Nuestros datos indicaron también que la inhibición de su transcripción durante el tratamiento con 5-FU es transitoria y reversible, independientemente del alelotipo, ya que el polimorfismo afecta a la proteína y no a la transcripción. De hecho, en el caso de los cultivos *MTHFR* 677TT tratados con 500uM de 5-FU, a las 72 horas de haberles retirado la droga, la expresión de ARNm de *MTHFR* es la mitad que en el control no tratado. Aparte de la desregulación metabólica por el exceso de droga, confirmaría la hipótesis anterior, en la que el sustrato acumulado por la disfunción enzimática es utilizado por el 5-FU para inhibir a TS. Puesto que el medio de cultivo es rico en nutrientes, no es necesario que se incrementen los niveles de ARNm tras retirar la droga del medio, puesto que la célula no tiene carencias.

En el caso de los heterocigotos 677CT, los niveles de ARNm de *MTHFR* aumentaban ligeramente cuando la dosis de 5-FU no era muy elevada. Al contrario que en líneas homocigotas mutantes 677TT, después de 72 horas en medio sin droga, las células que habían sido tratadas con dosis de 500uM presentaban niveles de ARNm de *MTHFR* muy superiores al control sin tratar (Figura 46).

Un dato a destacar es que la expresión de ARNm de *MTHFR* en heterocigotos no se elevaba a concentraciones de 50uM, sino a 500uM. Parece que este genotipo conforma un punto medio entre ambos homocigotos, de manera que una dosis baja de 5-FU les ayuda a eliminar el 5,10-MTHF excedente, pero el exceso de dosis desequilibraría los niveles de folato y del donador de grupos metilos, SAM.

4.1.6.1.3. Estado de p53 y su expresión en líneas celulares

De las ocho líneas celulares en las que se analizó la expresión de p53, la mitad eran *p53* normales (HCT-116, SW48, A549 y MCF-7) y la mitad tenían *p53* mutado (SW620, SW480, DLD-1 y HT-29). Cuando analizamos la frecuencia de apoptosis por TUNEL (apartado 3.3 de estos resultados), observamos que en líneas celulares resistentes al tratamiento (SW48 y SW620), la muerte celular parecía producirse por un proceso no apoptótico. Decidimos

entonces comprobar el estado de *p53* y su posible vinculación con la muerte por apoptosis en líneas sensibles a 5-FU. Puesto que el porcentaje de células apoptóticas en líneas sensibles a 5-FU se incrementaba de manera dosis-dependiente, quisimos evaluar los niveles de ARNm de *p53* en estos cultivos tratados.

En líneas con *p53* mutante, los niveles de ARNm de células tratadas con 5-FU eran, en general, menores que los del control negativo sin tratar tanto a 24, 48 y 72 horas de exposición a la droga como 72 horas después de refrescar el medio. No obstante, estas diferencias no eran significativas y consideramos que en estas células los niveles de ARNm de *p53* no varían con el tratamiento. En las líneas celulares que tenían *p53 wild type*, los resultados fueron idénticos, por lo que no parece que la acción de la droga induzca o altere transcripción de *p53*. Estos resultados son coherentes con los publicados en la bibliografía, donde se demostraba que la apoptosis en líneas celulares tratadas con 5-FU podía producirse de manera independiente a *p53* (Arango et al., 2001).

De un modo subyacente, estos resultados parecían indicar que el genotipo mutante para *p53* sí producía transcripción de ARNm. Por tanto, supusimos que la falta de funcionalidad se producía a nivel de la traducción de proteína o a un cambio en la estabilidad de la proteína TP53. Ésta se convertiría en un factor de transcripción activo. Esto puede estar mediado, al menos en parte, por la inactivación de algún regulador negativo de *p53*, como *MDM2*. Entonces TP53 actuaría como factor de transcripción de genes de respuesta a estrés. Estos genes son responsables de la parada del ciclo celular, senescencia celular y apoptosis.

Procedimos a comprobarlo mediante Western blot, como se explicará más adelante.

4.1.6.1.4. Comparación entre los niveles de expresión de ARNm de los genes *TYMS*, *TP*, *DPYD*, *MTHFR*, *P53*, *E2F1* y *RFC* en líneas celulares tumorales tratadas con diferentes dosis de 5-FU

Las diferencias de expresión entre tratamientos se hacían más patentes, en general, tras retirar la droga del medio, lo que se traduce en una respuesta celular a la presión ejercida por el 5-FU (Tabla 13).

	DIFERENCIAS ENTRE TRATAMIENTOS			
	24H	48H	72H	TT
A549	NS	*	**	NS
DLD1	**	**	*	***
HCT116	*	NS	***	*
HT29	NS	NS	NS	**
MCF7	NS	***	***	***
SW48	*	NS	NS	*
SW480	**	*	NS	**
SW620	NS	NS	NS	NS

Tabla 13: Análisis mediante el test de Kruskal-Wallis de las diferencias generales de expresión de *TYMS*, *TP*, *DPYD*, *MTHFR*, *p53*, *E2F1* y *RFC* según la dosis de exposición a 5-FU en líneas celulares de colon, mama y pulmón. NS: No significativo. *: significativo ($p < 0.05$), **: muy significativo ($p < 0.005$), ***: muy significativo ($p < 0.0001$).

Cuando se valoraron únicamente los niveles de expresión de ARNm, sin tener en cuenta polimorfismos, se observó que el incremento de expresión de *MTHFR* tras retirar la droga coincidía, en algunas líneas celulares sensibles y resistentes, con un aumento en los niveles de ARNm de *TP*. *TP* es la enzima anabolizante de 5-FU, lo que parece indicar que la droga inducía la expresión de sus propios activadores. Particularmente, la línea resistente a 5-FU SW48, incrementaba los niveles de ARNm de *TYMS*, *TP*, *MTHFR*, *E2F1* y *RFC*, mientras que disminuía los niveles de *DPYD* tras permanecer 72 horas con medio normal en aquellos cultivos que habían sido tratados con concentraciones de 500uM de 5-FU (Figura 47), pero no en los tratados con dosis menores.

En cuanto al resto de genes desregulados en SW48, el promotor de *TYMS* contiene el alelo 3G. Este alelo se asocia con una expresión elevada de *TYMS* por encima de los niveles normales. Por tanto, no es anormal que su expresión se dispare tras retirar la droga. Mientras la molécula de 5-FU permanezca en el medio de cultivo, inhibirá a la enzima TS formando el complejo ternario con 5,10-MTHF. El alelo 3G induce la expresión de *TYMS* cuando las células se exponen a 5-FU. Al retirar la droga del medio, deja de inhibirse la proteína y la expresión de *TYMS* autorregulada por la proteína se dispara. Esta hiper-regulación conllevará un aumento de los niveles de ARNm de *TYMS* con respecto al control sin tratar, que son los que se observan por qRT-PCR. Si se tiene en cuenta que el promotor de *TYMS* está hemimetilado en esta línea celular, puede que la metilación no silencie la expresión del gen, al menos cuando está presente sólo en uno de los dos alelos. No obstante, y como ya hemos indicado anteriormente, no se han realizado ensayos con agentes desmetilantes para comprobar esta hipótesis.

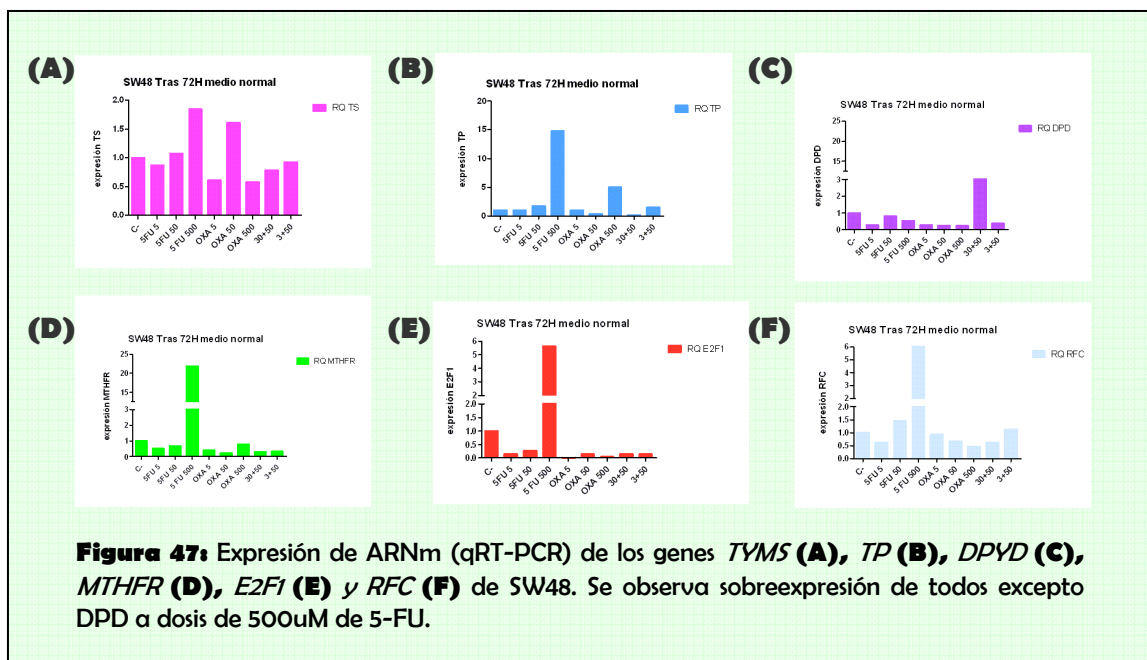
Estos niveles acrecentados de *TYMS* correlacionan con la expresión elevada de *E2F1*, lo que ratifica los datos de otros investigadores donde *TYMS* aparecía regulada a nivel transcripcional por *E2F1* (Banerjee et al., 1998). Parece ser que la proteína E2F1 es un factor de transcripción que induce la expresión de diversos genes de la fase de síntesis del ciclo celular (DeGregori et al., 1995). TS se encuentra entre estos genes, por ello la sobreexpresión de *E2F1* se refleja en los niveles elevados de ARNm de *TYMS*.

Por otro lado, la sobreexpresión en SW48 de *RFC*, transportador de folato reducido, podría ser una consecuencia derivada del exceso de folato que conlleva la sobreexpresión de *TYMS* y *MTHFR*. Esta teoría se apoya en los datos publicados recientemente (Ifergan et al., 2008).

Análogamente, se observó en SW48 una sobreexpresión de *TP*. Es llamativo porque el promotor de *TP* en SW48 se encuentra hemimetilado, por lo que parece necesaria al menos la metilación de ambas copias u otros mecanismos epigenéticos accesorios para silenciar la expresión de este gen.

En el caso de *DPYD* no se observaron variaciones en los niveles de expresión de SW48 durante el tratamiento con 5-FU; estos resultados eran esperables puesto que SW48 tiene

metilado el promotor de *DPYD* y esta metilación aberrante seguramente sea responsable de su silenciamiento.



Un dato llamativo fue la sobreexpresión de *RFC* en líneas *p53* normales tratadas con 500uM de 5-FU a las 72 horas de haber retirado la droga del medio. Esta sobreexpresión, en general, se mostraba junto con niveles incrementados de *MTHFR* y *E2F1*. Parece, una vez más, que la dosis excesiva de la droga produce una desregulación generalizada de la expresión de diversos genes, entre ellos los que intervienen en la ruta metabólica del ácido fólico y los de la fase S del ciclo celular.

En líneas *p53* mutantes esta relación no se apreciaba tan claramente. Este hecho es bastante racional puesto que estas células carecen del mecanismo principal de respuesta celular a estrés provocado por el tratamiento con 5-FU: daño al ADN, desregulación del equilibrio de nucleótidos, etc.

Se podría aumentar el tamaño muestral para comprobar si la ausencia de *p53* no influye en un aumento de expresión de ARNm de *TYMS* cuyo promotor se encuentra regulado negativamente por la proteína TP53 (Lee et al., 1997).

4.1.6.1.5. Variación en los niveles de expresión de ARNm asociada con el tiempo de exposición a 5-FU

Aunque queríamos centrar el estudio en las líneas celulares de colon DLD1, HCT116, HT29, SW48, SW480 y SW620, también analizamos MCF7 (mama) y A549 (pulmón) con el

fin de determinar si la variación en la expresión era debida en parte al tipo de tejido. Además, en estos tipos tumorales también se emplea habitualmente el tratamiento con 5-FU/oxaliplatino.

	DIFERENCIAS ENTRE TIEMPO EXPOSICIÓN						
	RQ TS	RQ TP	RQ DPD	RQ MTHFR	RQ P53	RQ E2F1	RQ RFC
A549	24/TT ** 48/TT** 72/TT**	72/TT*	24/72*	48/72* 72/TT*	24/48*** 24/72** 24/TT**	NS	NS
DLD1	24/72*	NS	NS	NS	48/TT*	NS	NS
HCT116	24/72*	NS	24/TT* 72/TT**	24/72** 48/72* 72/TT*	48/72***	24/TT** 48/72* 48/TT***	48/TT***
HT29	48/TT*	NS	24/72* 24/TT*	24/48**	NS	NS	NS
MCF7	24/48** 24/72* 48/TT*** 72/TT*	24/TT** 48/TT**	24/TT**	24/TT* 48/TT*	24/72* 72/TT**	24/48* 48/TT*** 72/TT*	24/48*** 48/TT**
SW48	NS	24/48* 48/72***	24/72*** 48/72* 72/TT*	NS	NS	48/TT*	NS
SW480	NS	NS	24/TT*	24/72** 48/72***	NS	24/48** 48/72** 48/TT*	24/48* 48/72* 48/TT***
SW620	24/48* 24/72***	24/48** 24/72**	24/72*** 72/TT***	48/72***	48/72*** 48/TT**	72/TT*	24/TT**

Tabla 14: Análisis mediante el test de Kruskal-Wallis de las diferencias en los niveles de expresión de *TYMS*, *TP*, *DPYD*, *MTHFR*, *p53*, *E2F1* y *RFC* según los diferentes tiempos de exposición a 5-FU en líneas celulares de colon, mama y pulmón. NS: No significativo. *: Significativo ($p < 0.05$), **: muy significativo ($p < 0.005$), ***: muy significativo ($p < 0.0001$). Se observa que, por lo general, eran necesarias más de 24 horas para ver cambios de expresión. Sobre todo se observan alteraciones significativas tras 72 horas de cultivo con medio fresco, una vez retirada la droga. Esta correlación era independiente de la concentración de la droga en el medio. Las diferencias se establecieron a partir de comparaciones entre los cultivos tratados con las mismas dosis pero a diferentes tiempos de exposición.

a) Expresión de *TYMS* y *E2F1* a las 24, 48, 72 horas de tratamiento y 72 horas después del tratamiento

Al realizar el test de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias muy significativas de expresión de *TYMS* en las células A549 tratadas con 5-FU a 24, 48 y 72 con los niveles de ARNm medidos 72 horas después de retirar el tratamiento (Tabla 14). Estas diferencias se correspondían con una sobreexpresión de ARNm de *TYMS* 15 veces superior en las células tratadas con 500uM de 5-FU al retirarles la droga del medio con respecto al control sin

tratar. Como se mencionó anteriormente, puede ser un mecanismo celular para reequilibrar el *pool* de folato así como el estado de metilación normal y la síntesis de ADN. Este mismo efecto ocurre en MCF7, HCT116 y HT29, y el test de Kruskal-Wallis indicó que no estaba relacionado con la falta de expresión de *p53*, por lo que podría ser debido a una autorregulación de la propia Timidilato Sintetasa.

En DLD1 se encontraron valores de ARNm de *TYMS* significativamente más elevados a las 24 horas con respecto a las 72 horas de exposición, pero sólo a dosis de 500uM de 5-FU (Figura 48). Por consiguiente, podría ser un efecto puntual que tiene lugar en la fase exponencial de crecimiento en una línea con una tasa de duplicación muy elevada (aproximadamente cada 20 horas). DLD-1 tiene, con diferencia, la tasa de duplicación más elevada de las líneas estudiadas (20h vs 24-26h). En esta fase la célula necesitaría sintetizar nucleótidos y el 5-FU inhibe a TS, lo que induciría su regulación positiva.

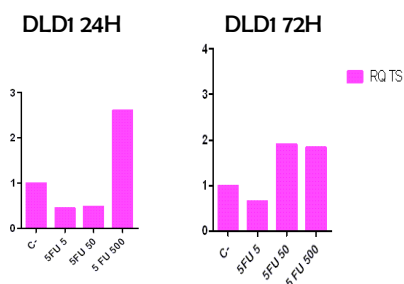


Figura 48: Expresión de *TYMS* en DLD1 a las 24 y 72 horas de exposición a diferentes dosis de 5-FU y oxaliplatino.

En el caso de las líneas resistentes a 5-FU, SW48 que tiene el alelo 3G no presentó diferencias de expresión, mientras que SW620 (2R/2R) mostró una disminución muy significativa en los niveles de ARNm cuando se trataba con altas dosis de 5-FU al cabo de 72 horas. Estos resultados parecen corroborar que la tasa de transcripción es mayor y más estable (menos alterable por el tratamiento con 5-FU) en células con el alelo 3G (Horie et al., 1995; Iacopetta et al., 2001). Parece que SW620 es resistente a dosis de 5-FU normales, pero las células se ven afectadas cuando la dosis es 500uM. Estos datos son también coherentes con los de las citometrías, donde se mostraba la parada del ciclo celular en G1 a las 72 horas. Es decir, hasta las 72 horas no se acumula la dosis de 5-FU necesaria para parar el ciclo celular o para que tengan lugar las consecuencias que 5-FU induce en la célula.

Después de un análisis global, es importante destacar que nuestros resultados de expresión de *TYMS* y *E2F1* no correlacionaban. Estos datos discrepan de los publicados anteriormente en cuanto a que la sobreexpresión de *E2F1* promueve la de *TYMS* y es un factor pronóstico de respuesta pobre a 5-FU (Kashara et al., 2000). No obstante, algunas líneas expuestas a altas dosis de 5-FU tenían niveles muy elevados de *E2F1*, tanto durante la exposición como después de haber retirado la droga del medio, lo que parece indicar que el 5-FU también puede inducir la expresión de *E2F1*. Por otro lado, nuestros resultados convergen con los de Belvedere y colaboradores, que concluyeron, tras analizar la expresión proteica por inmunohistoquímica, que los niveles de *E2F1* y *TYMS* en muestras tumorales no

correlacionaban. En nuestro análisis, los niveles de ARNm de *E2F1* tampoco se asociaban con sensibilidad ni respuesta. Por tanto, *E2F1* no parece ser un buen candidato a utilizar como marcador predictivo de respuesta a 5-FU.

b) Expresión de TP y DPD a las 24, 48, 72 horas de tratamiento y 72 horas después de haber retirado el tratamiento

En líneas generales, la expresión de *TP* aumentaba con el tiempo de exposición a 5-FU, y disminuía al retirar la droga del medio

Por otro lado, *DPYD* apenas variaba con los tiempos de exposición, excepto casos puntuales.

Al igual que en el caso de *TYMS*, la expresión de *TP* variaba en las líneas A549 y MCF7, 72 horas después de haber retirado la droga del medio. En ambos casos la diferencia radicaba, una vez más, en las células tratadas con dosis muy altas de 5-FU. Curiosamente, en A549 la expresión de *TP* se regulaba negativamente tras retirar la droga, y se observó en paralelo una sobreexpresión de *DPYD*. Estos datos eran esperables puesto que *DPYD* se encarga de mantener el equilibrio en el metabolismo del 5-FU. No obstante, la expresión de *DPYD* varía dependiendo del tejido y de la línea celular, por lo que también sería informativo analizar los polimorfismos que presenta cada línea celular para este gen, dado que también influyen en los niveles de expresión (Van Kuilenburg et al., 2005).

A diferencia de A549, en MCF7 a las 72 horas de haber retirado la droga del medio, *TP* se expresaba 20 veces más en aquellas células que habían sido expuestas a altas dosis de 5-FU que en las que no fueron tratadas o se expusieron a dosis bajas. Intuitivamente se esperaría que la expresión de *TP* se reprimiera ante la ausencia de sustrato (5-FU) en el medio. Es decir, una vez retirado el sustrato, la traducción se regularía negativamente por ahorro celular, si considerásemos que la expresión de este gen simplemente fuese regulada en función de las necesidades metabólicas. Sin embargo, al analizar detenidamente los datos de expresión de MCF7 después del tratamiento, vimos que las células tratadas con 500uM de 5-FU tenían disparada la expresión de todos los genes (Figura 49). Este efecto no se apreciaba a dosis menores de 5-FU. Este último dato confirmaría que la dosis desproporcionada de 5-FU promueve una desregulación completa de las rutas metabólicas celulares.

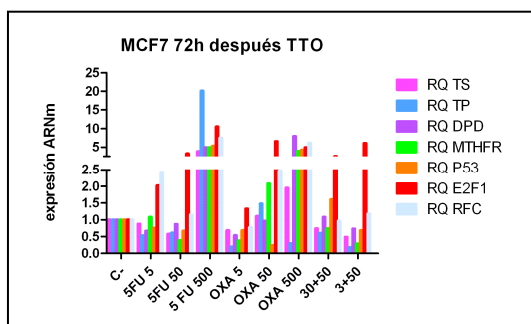


Figura 49: Expresión de *TYMS*, *TP*, *DPYD*, *MTHFR*, *p53*, *E2F1* y *RFC* en la línea celular MCF7 72 horas después de haber retirado el tratamiento. Se observa sobreexpresión generalizada en las células tratadas con 500uM de 5-FU.

Con respecto a las dos líneas celulares resistentes a 5-FU analizadas en este estudio, SW620 prácticamente no expresaba *TP* cuando se trataba con dosis mínimas. Este dato explicaría en parte su resistencia a la droga. Aun así, se observó aumento de expresión de *TP* directamente proporcional al aumento de la dosis. Esta última referencia parece apoyar la hipótesis de que la droga induce su propia activación.

Paralelamente, la expresión de *DPYD* en SW620 también se incrementaba de forma proporcional a la dosis. Al retirar el tratamiento se producía el efecto contrario, es decir, el grado de disminución era inversamente proporcional a la dosis (Figura 50). Por tanto, parece que la presencia de 5-FU induce la expresión de los genes implicados en su metabolismo y su ausencia, el silenciamiento de los mismos.

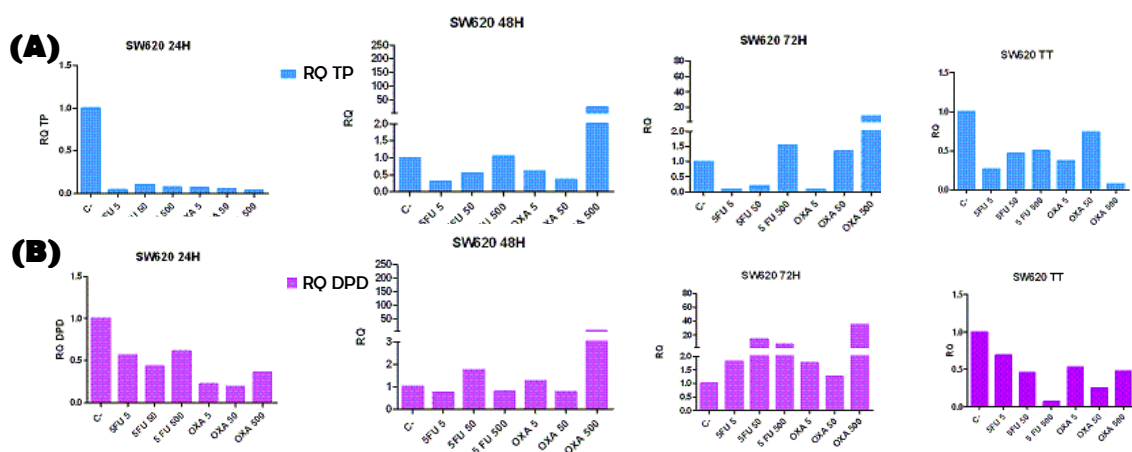


Figura 50. Expresión de *TP* (A) y *DPYD* (B) de la línea celular SW620 tratada con diferentes dosis de 5-FU y oxaliplatino solos o en combinación durante 24, 48, 72 horas y después de 72 horas de haber sido tratadas.

La otra línea resistente analizada, SW48, tenía metilado el promotor de *DPYD* como ya explicamos anteriormente y esta metilación aberrante podría ser la responsable de la baja o prácticamente nula expresión del gen. La expresión y el estado de metilación, no se veían modificados por los tratamientos. Sin embargo, sobreexpresaba *TP* las primeras 48 horas a dosis bajas de 5-FU. Dado que el promotor de *TP* en SW48 está hemimetilado, como también indicamos precedentemente, parece que el silenciamiento del control sin tratar se debe a la hemimetilación, que produce una menor tasa transcripcional. Parece que este mecanismo es reversible tras los tratamientos de 500 μM de 5-FU durante 48 horas, ya que las células que habían estado expuestas a estas dosis, sobreexpresaban *TP* (Figura 51). Considerando que esas células también sobreexpresaban *TYMS*, *MTHFR*, *E2F1* y *RFC* al retirarles la droga del medio (Figura 52), podríamos suponer que se trata, una vez más, del desequilibrio inducido por el 5-Fluorouracilo. De hecho, se observa también una

sobreexpresión de todos estos genes a dosis altas de oxaliplatino, independientemente del estado basal de transcripción en el control.

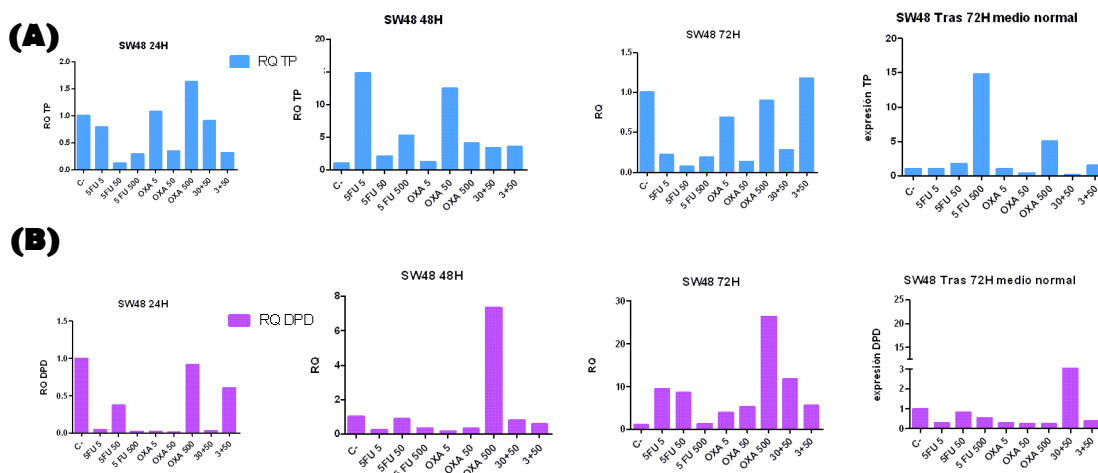


Figura 51: Expresión de *TP* (A) y *DPYD* (B) de la línea celular SW620 tratada con diferentes dosis de 5-FU y oxaliplatino solos o en combinación durante 24, 48, 72 horas y después de 72 horas de haber sido tratadas. Se observa un aumento desproporcionado de la expresión de *TP* en las células tratadas con dosis de 500uM de 5-FU a las 72 horas de haber retirado la droga del medio.

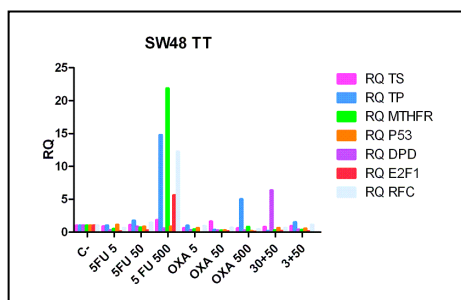


Figura 52: Expresión en SW48 72 horas después de retirar la droga del medio. Se observa un pico de expresión de ARNm de *TYMS*, *TP*, *MTHFR*, *E2F1* y *RFC*. Es posible que la dosis excesiva de 500uM de 5-FU produzca una desregulación general de la homeostasis celular.

En líneas sensibles, se produce un aumento de *TP* y *DPYD* a partir de las 48 horas de exposición a 5-FU. Cuando la dosis es de 500uM, este aumento se manifiesta en las primeras 24 horas de tratamiento. Al retirar la droga del medio, en general *TP* disminuye y *DPYD* permanece elevado. Es posible que *DPYD* sea necesario para catabolizar la cantidad de 5-FU acumulada durante el tratamiento. Sin embargo, *TP*, ante la falta de sustrato reprimiría su expresión por ahorro celular.

4.1.7. Análisis de la expresión proteica de *TYMS* in vitro en líneas celulares tratadas con 5-FU/oxaliplatino

4.1.7.1. Análisis de la expresión proteica por Inmunocitoquímica

La tinción inmunocitoquímica con el anticuerpo de *TYMS* en las 17 líneas celulares tras 72 horas de exposición al tratamiento, mostró una fuerte correlación positiva generalizada

entre la dosis de 5-FU administrada y la cantidad de proteína observada. Estos resultados se correlacionan con los datos publicados anteriormente (Berger et al., 1987; Clark et al., 1987; Spears et al., 1982; Washtein et al., 1984; Chu et al., 1990; Keyomarsi et al., 1988). No obstante, al combinar el tratamiento con oxaliplatino, la cantidad de señal era algo menor, principalmente porque el daño generalizado que produce este agente, conlleva una disminución de la población celular (Figura 53).

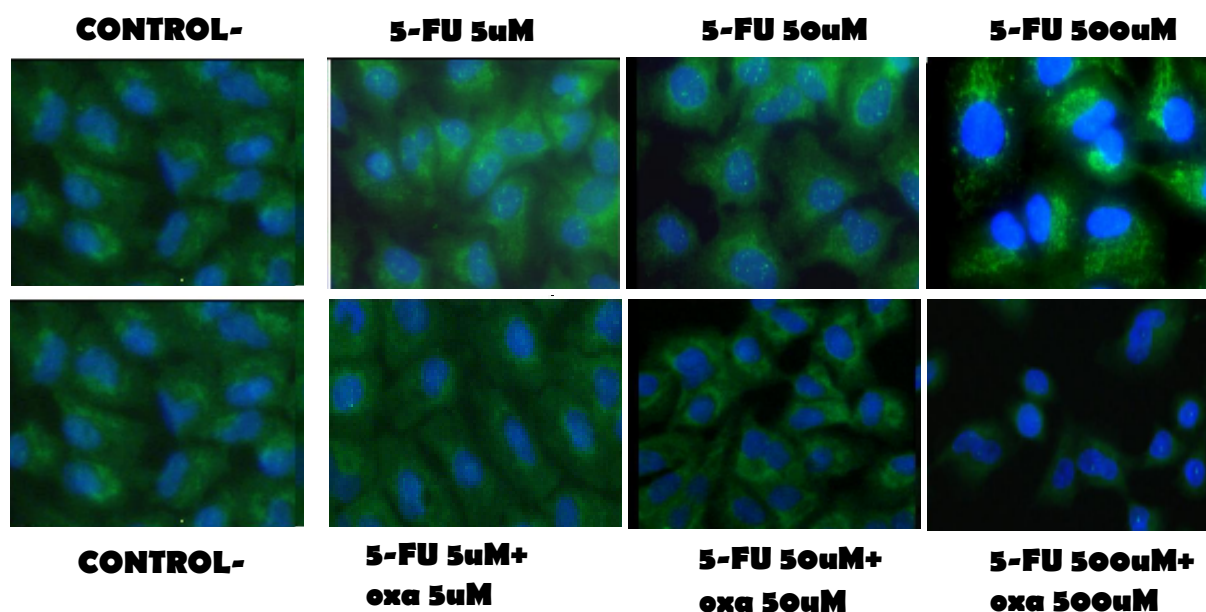


Figura 53: Microscopía confocal 20x: Tinción Inmunocitoquímica con anticuerpo TS 106-clone y DAPI en células A549 tras 72 horas de exposición a diferentes dosis de 5-FU solo o en combinación con oxaliplatino

Se compararon los resultados de expresión proteica medidos por inmunocitoquímica con los datos de expresión a nivel de ARNm obtenidos por qRT-PCR. En general, los niveles de expresión de ambos correlacionaban tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU. No obstante, las diferencias de expresión observadas entre tratamientos eran mayores a nivel de ARNm que a nivel de proteína.

Lo más llamativo de la tinción con el anticuerpo para TS fue que mostró positividad nuclear en algunas líneas celulares. Esta tinción se encontraba muy localizada en el nucleolo en la mayoría de los casos y se observó tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU. Este dato es de vital importancia en el análisis de expresión de *TYMS* tras el tratamiento con 5-Fluorouracilo, puesto que pocos autores habían descrito su localización nuclear y nunca antes se había determinado su localización nucleolar.

Otro dato de gran interés fue que la translocación de TS al núcleo se incrementaba al aumentar la dosis de 5-FU. Este hecho también resulta novedoso en el estudio de expresión de *TYMS*. La observación de las inmunotinciones permitió determinar que la cantidad de proteína TS aumentaba con la dosis de 5-FU sobre todo en el citoplasma celular. Sin

embargo, conforme se incrementaba la concentración de la droga en el medio, la proteína se translocaba al núcleo celular tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU. En este caso, la diferencia entre líneas sensibles y resistentes radicaba en que en las primeras se translocaba a dosis mucho más bajas que en las últimas (Figura 54).

Este importante hallazgo de carácter innovador no sólo se observó en líneas de colon, sino también en mama (MCF-7) y pulmón (A549).

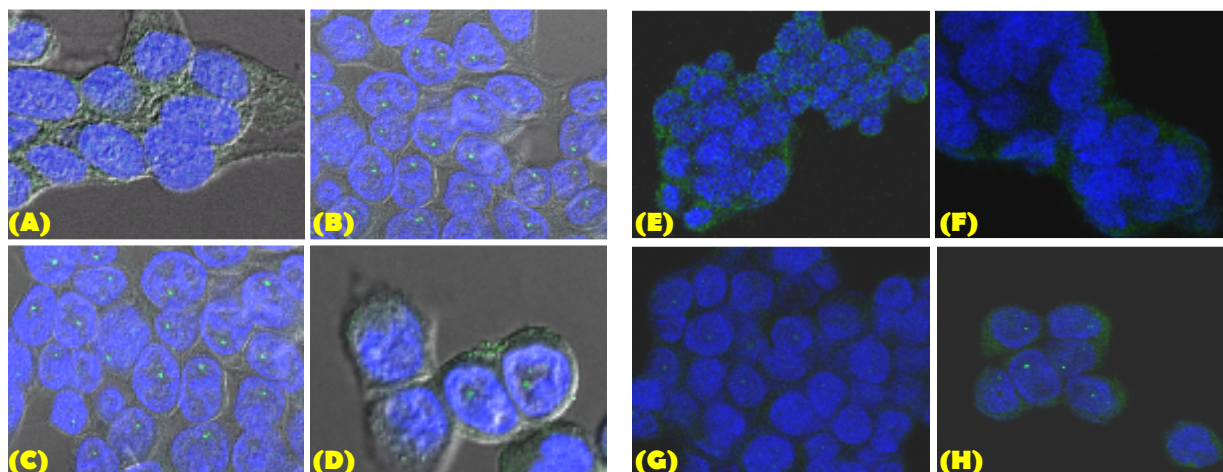


Figura 54: Microscopía confocal 20x: Tinción Inmunocitoquímica con anticuerpo TS 106 clone y DAPI en células SW48(A-D) y SW620 (E-H) tras 72 horas de exposición a diferentes dosis de 5-FU. Se observa localización nucleolar de la proteína. (A y E) Controles sin tratar, (B y F) 5-FU 5uM, (C y G) 5-FU 50uM y (D y H) 5-FU 500uM. Se aprecian acúmulos de tinción en el núcleo celular, aparentemente sublocalizada en el nucleolo. Se observa un aumento de positividad tanto nuclear como citoplasmática a medida que aumenta la dosis de 5-FU.

4.1.7.2. *Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot*

4.1.7.2.1. *Timidilato Sintetasa*

Para corroborar los resultados de las inmunocitoquímicas, se procedió a analizar el patrón de expresión de proteína en las líneas celulares expuestas a distintas dosis de 5-FU durante 72 horas. Puesto que se había detectado expresión nuclear de la enzima, se realizó una separación de proteína citoplasmática y nuclear de cada uno de los *pellets* celulares recogidos tras los distintos tratamientos con escalado de dosis a diferentes tiempos, y en las diferentes líneas celulares.

Los resultados de Western blot de cada línea celular fueron muy similares a los encontrados por inmunocitoquímica.

Un dato de lo más interesante fue el indicio de que la señal de proteína TS citoplasmática aumentaba con la dosis de 5-FU. Este dato apoya la hipótesis de sobreexpresión de *TYMS* al tratar con 5-FU. Como ya se observó en el análisis de ARNm,

parece confirmarse que la expresión proteica también está regulada por la presencia de 5-FU en el medio de cultivo.

4.1.7.2.2. El complejo ternario (5-FU + TYMS + 5,10-MTHF)

La revelación más interesante del Western Blot residió en que la formación del complejo ternario únicamente tenía lugar a partir de la concentración 50uM en todas las líneas celulares ensayadas. De manera que las líneas tratadas con 5uM no diferían del control (Figura 55). Este dato es informativo acerca de la fuerza con que se unen los tres elementos del complejo y también acerca de las concentraciones de folato requeridas para inhibir a la Timidilato Sintasa. Esta afirmación se basa en que tras la desnaturalización a 95º (paso necesario en el protocolo de Western Blot) los tres elementos permanecen unidos.

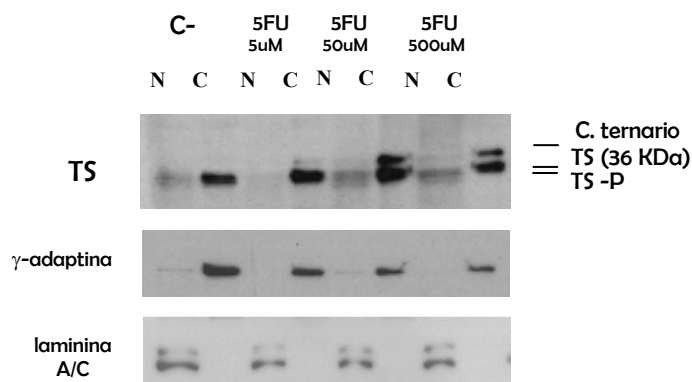


Figura 55: Western Blot de TS de la línea celular A549 tras 72 horas de exposición a diferentes dosis de 5-FU. N: Fracción nuclear, C: fracción citoplasmática. C-: células sin tratamiento, TS-P: forma fosforilada. Se observa la formación del complejo ternario a partir de la dosis 50uM de 5-FU. Se observa tinción también en la fracción nuclear, aunque es muy débil. Teniendo en cuenta la débil tinción de la laminina (proteína de localización exclusivamente nuclear), no es raro que la Timidilato Sintasa tenga una tinción muy ligera en esta fracción.

También se observó señal de proteína TS en la fracción nuclear, y aunque la señal era muy débil, se pudo dilucidar que la proteína presente en el núcleo era únicamente la forma libre de TS. Es probable que al separar las dos fracciones de proteína, se produzcan pérdidas que hagan que la técnica de Western Blot sea menos sensible que la Inmunotinción. De hecho, se puede apreciar en proteínas como la laminina, exclusivamente nuclear, cuya tinción se ve sensiblemente reducida. Además, el tratamiento con altas dosis de la droga altera la estabilidad de las proteínas. Este supuesto se puede comprobar en proteínas constitutivas como la γ -adaptina, cuya expresión está visiblemente reducida en las células tratadas con 5-FU.

Algunos investigadores que han registrado presencia de TS en el núcleo también aseguran que sólo existía en su forma libre, lo que podría indicar que el 5-dUMP no puede atravesar la membrana nuclear o que la configuración de TS en ambas formas es distinta (Bissoon-Haqqani et al., 2006). Estos datos corroborarían nuestra hipótesis de la funcionalidad de TS en el núcleo, puesto que para unirse al ARNm tiene que estar en su forma libre. Es decir, TS se translocaría al núcleo para unirse al ARNm de *p53* y estabilizarlo, de manera que la célula activara los mecanismos de apoptosis. El incremento en la cantidad de TS nuclear al aumentar la dosis de 5-FU estaría de acuerdo con este supuesto. Cuanto mayor es la dosis administrada, mayor porcentaje de apoptosis se produciría, tal y como describimos anteriormente en esta tesis.

4.1.7.2.3. *p53*

Sobre las mismas membranas de Western Blot utilizadas para cuantificar la expresión de *TYMS*, se realizó la incubación con el anticuerpo anti-TP53 y se observó que en líneas con genotipo *p53* normal, como A549 o SW48, se producía un claro incremento de proteína TP53, sobre todo nuclear, cuando TS se translocaba al núcleo (Figura 56A). Dado que la cantidad de TS presente en el núcleo aumentaba con la concentración de 5-FU administrada, este aumento se reflejaba también en los niveles proteicos de *p53*. Este proceso ocurría en líneas *p53* normales, independientemente del genotipo de *TYMS* (polimorfismos TSER y 3'UTR).

En el caso de la línea resistente SW48, este aumento de TP53 se correspondía con la parada del ciclo celular en el límite G1/S.

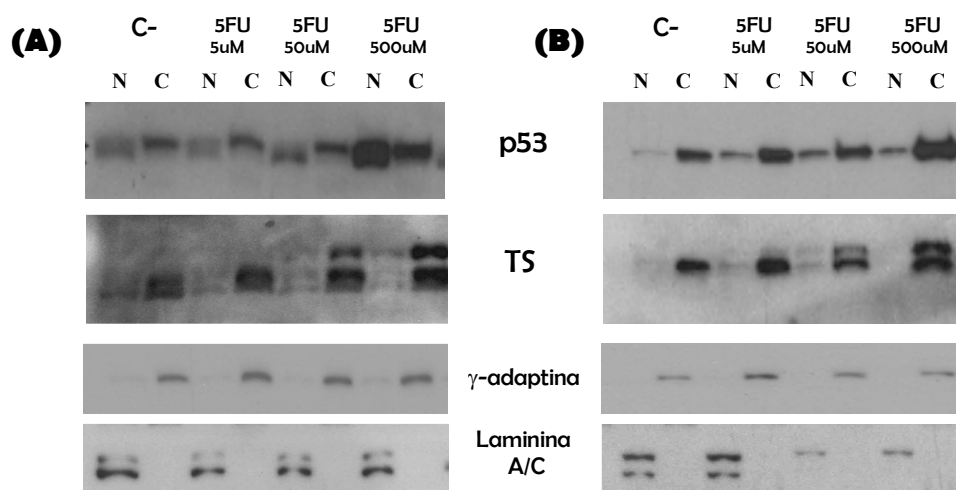


Figura 56: Western Blot de TP53 y TS de las líneas celulares A549 **(A)** y DLD1 **(B)** tras 72 horas de exposición a diferentes dosis de 5-FU. N: Fracción nuclear, C: fracción citoplasmática. C-: células sin tratamiento. Se observa la formación del complejo ternario en ambas líneas celulares a partir de la dosis de 50uM de 5-FU. En la línea A549 (*p53*⁺) se observa un incremento de p53 en la fracción nuclear cuando TS se localiza en el núcleo. En cambio, en DLD1 (*p53*⁻), la expresión nuclear de TP53 no varía.

En cambio, en líneas con *p53* alterado, como DLD1 o HT29, la expresión proteica de *p53* nuclear no estaba asociada a la localización subcelular de TS, mientras que la expresión citoplasmática aumentaba a la vez que ésta (Fig 56B). Es decir, TP53 se localizaba en el núcleo independientemente de que TS lo hiciera o no. Sin embargo, la expresión citoplasmática de *p53* aumentaba al mismo tiempo que lo hacía TS de manera dosis-dependiente.

Estos datos no estarían de acuerdo con los que obtuvieron Chu y colaboradores (1999), quienes postulaban que la proteína TS se une a la región codificante del ARNm de *p53* en el núcleo formando un complejo biológicamente activo que inhibe la traducción de la proteína TP53. En nuestras muestras, no sólo no inhibía la expresión de *p53*, sino que parecía estimularla. Aunque también es posible que la exposición a 500uM de 5-FU durante 72 horas produzca un estrés celular que induzca apoptosis. Esta apoptosis estaría principalmente mediada por *p53* en aquellas líneas que tienen genotipo silvestre, y sería *p53* independiente en las de genotipo mutante. De este modo se explicaría por qué en las líneas *p53* mutantes no se observa aumento de expresión de *p53*. Aunque no se descarta que *p53* regule la expresión de *TYMS*.

Es decir, en las líneas con *p53* normal, la translocación de TS al núcleo conllevaría una estabilización TP53 o bien una activación de su traducción por unión de TS a su ARNm. TP53 no se transportaría hacia el proteasoma por la acción de MDM2, sino que iniciaría la cascada de señales para la entrada en apoptosis de la célula.

Por otro lado, en las líneas que tienen *p53* mutante, al recibir dosis elevadas de 5-FU, TS se transloca al núcleo pero no se une a *p53*. El estrés celular originado por la droga desembocaría en una desregulación de los procesos metabólicos celulares, entre ellos la inactividad de TS, que produciría un desequilibrio en el reservorio de nucleótidos.

RESULTADOS II: PACIENTES

4.2.1. Caracterización de los tumores en relación con factores clinicopatológicos

En el presente estudio participaron 156 pacientes, de los cuales el 60% (94 de 156) eran hombres y el resto mujeres, de edades comprendidas entre los 35 y los 68 años, con una media de 54 años. Del total de la población, 143 pacientes presentaban cáncer de colon, y de éstos, 42 pacientes no fueron incluidos a la hora de realizar algunos análisis estadísticos por falta de datos o muestra.

Con el fin de hacer un estudio homogéneo, para el análisis estadístico se utilizaron únicamente los pacientes de cáncer colorrectal (143 de 156). Para estudios epidemiológicos, esta población se dividió en dos grupos, mayores y menores de 45 años. Se definió de esta manera para evitar el sesgo en los datos poniendo un umbral más elevado, puesto que era una población joven comparada con la media de edad común en cáncer colorrectal. Al analizar las características clinicopatológicas de la población, resultó que un 69.31% de los pacientes de cáncer colorrectal tenían el tumor localizado en el lado izquierdo (distal o colon descendente), mientras que el resto lo tenía en el lado derecho (proximal o ascendente). Por otro lado, el 11.88% presentaban tumores en estadio A de Duke, el 59.41% en estadio B y el 28.71% en estadios C y D. Para la significancia estadística, se agruparon los pacientes en estadios A y B como fases tempranas de la enfermedad, y por otro lado, C y D, como fases avanzadas.

En cuanto a los hábitos alimentarios, 38.61% de los pacientes llevaba una dieta considerada de bajo riesgo o *low risk*, que consistía en una alta ingesta de folatos y bajo consumo de alcohol, mientras que el resto tenía una dieta de alto riesgo (baja ingesta de folatos y alto consumo del alcohol) con respecto al tratamiento basado en 5-Fluorouracilo. La dieta considerada de bajo riesgo se debe a que la ingesta de folatos permite el funcionamiento correcto de la ruta metabólica del ácido fólico, en la que la Metionina Sintasa sintetiza Metionina a partir de Homocisteína gracias al grupo metilo del folato circulante. Por otro lado, la dieta de alto riesgo o baja ingesta de folato, produce una depleción de folato en sangre que conlleva un aumento de los niveles de TS, además, bloquea la síntesis de SAM, donador universal de grupos metilo, y desregula el mecanismo de metilación celular (Paz et al., 2002). La dieta de Bajo riesgo se asocia a menor predisposición de accidentes cardiovasculares, por reducción de los niveles de Homocisteína, y a menor riesgo de cáncer, especialmente cáncer de colon.

Con la intención de establecer una posible relación entre la edad de los individuos y el resto de parámetros clinicopatológicos, se analizaron todos ellos en las dos subpoblaciones, mayores y menores de 45 años. Al realizar el test de χ^2 no se hallaron asociaciones significativas entre la edad, el género de los pacientes, o el tipo de dieta que seguían con la lateralidad del tumor (Tabla 15). Sin embargo, y de acuerdo con los resultados obtenidos precedentemente por *Bedikian y colaboradores (Bedikian et al., 1981)*, se determinó que los

pacientes menores de 45 años, presentaban estadios tempranos de la enfermedad (Duke A-B) (χ^2 test, $p=0.0166$).

	Edad (años)		p valor
	<45 n= 129 (83,17%)	>45 n=27 (16,83%)	
Hombres	37,10%	43%	0,5158
Mujeres	52,90%	37%	
Izquierdo	64,70%	70,20%	0,5889
Derecho	35,30%	29,80%	
Estadio Duke			0,0166
A-B	100%	65%	
C-D	0%	35%	
Dieta			0,4329
Bajo riesgo	47%	37%	
Alto riesgo	53%	63%	

Tabla 15: Características de los tumores colorrectales en los diferentes grupos de edad. Test χ^2 ; p-valor significativo por debajo de 0.05.

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis para establecer si existía algún tipo de interacción entre la respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo y las características clinicopatológicas de cada paciente (Tabla 16). Los resultados obtenidos determinaron que el tipo de respuesta no depende del sexo del paciente, y tampoco de la localización del tumor. Sí que se comprobó, en cambio, que el 95% de los pacientes que respondían al tratamiento, presentaban tumores en estadios A-B (test χ^2 ; $p<0.0001$). La razón lógica de este hallazgo vendría dada porque la enfermedad se trata en sus inicios, cuando es más probable su remisión. Los tumores con estadio bajo no penetran en la pared intestinal (estadio A de Duke) y en caso de ser penetrantes, no presentan metástasis en nódulos linfoides (estadio B de Duke) (Freeny et al., 1986). Esta enfermedad localizada hace más factible su tratamiento exitoso. Además, estos tumores suelen estar poco desdiferenciados, por lo que no son tan heterogéneos en cuanto a subpoblaciones celulares como los de estadios más avanzados.

Otro hallazgo que merece la pena destacar es que aquellos pacientes que seguían una dieta de alto riesgo no respondían al tratamiento con 5-Fluorouracilo (test χ^2 , $p=0.0064$; Fisher test, $p=0.0496$), por lo que los hábitos alimentarios podrían ser no sólo un factor de riesgo de padecer cáncer colorrectal, sino un factor predictivo de la enfermedad. La evaluación de la dieta seguida por estos pacientes se realizó mediante una encuesta que se adjunta en el Anexo I. En ella se preguntaba por la frecuencia de la ingesta de frutos secos, así como verduras, pescados, etc. y alcohol. La frecuencia de dieta de bajo riesgo fue del

38.6%, mientras que el resto tenían una dieta de alto riesgo, bien por el consumo de alcohol o por la baja ingesta de folatos (*Anexo II*). Dada la significancia estadística encontrada entre la dieta de algo riesgo y la ausencia de respuesta a la terapia basada en 5-FU, resulta imprescindible realizar este tipo de encuestas a los pacientes antes de administrarles el tratamiento.

La respuesta a la terapia basada en 5-FU está estrechamente ligada con la tolerancia a la misma. En este estudio se comprobó que los pacientes que mostraban una toxicidad mayor de dos según el criterio de la Organización Mundial de la Salud (ver materiales y métodos), no respondían al tratamiento (Fisher test, $p < 0.0001$).

Respuesta al tratamiento con 5-FU/oxaliplatino			
	R	NR	
	n= 62 (39,6%)	n=94 (60,4%)	p valor
Hombres	67,50%	55,70%	
Mujeres	32,50%	44,30%	0,2372
Izquierdo	72,50%	67,20%	
Derecho	27,50%	32,80%	0,5732
Estadio Duke			
A-B	95%	55,70%	
C-D	5%	44,30%	<0.0001
Dieta			
LR	57,50%	26,00%	
HR	17,50%	34,00%	
IR	25,00%	40,00%	0,0064
HR	25%	44,00%	
LR+IR	75%	66,00%	0,0631
IR+HR	32,50%	42,60%	
LR	67,50%	57,40%	0.3068

Tabla 16: χ^2 , p-valor significativo por debajo de 0.05. Test de interacción entre las características clinicopatológicas de los pacientes con tumores colorrectales y la respuesta al tratamiento con 5-FU.

4.2.2. Evaluación de la respuesta y toxicidad en pacientes de cáncer colorrectal tratados con quimioterapia basada en 5-FU/Oxaliplatino

La valoración objetiva de los síntomas producidos por la terapia así como de otros factores de interés para nuestro estudio, tales como la dieta que seguía cada paciente,

actividad deportiva, consumo de tabaco, etc., se realizó a partir de una encuesta (*Anexo I*) cuyos datos fueron analizados por duplicado de manera independiente.

Algunos factores como la edad de los individuos, sus hábitos alimentarios o el consumo de alcohol, pueden resultar determinantes en la respuesta a quimioterapia con 5-FU. La edad de los pacientes de cáncer colorrectal suele asociarse con la lateralidad del tumor, de manera que la localización proximal se diagnostica a edades más avanzadas. Además, el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) está más ligado al envejecimiento que al proceso neoplásico (Yamashita et al., 2003).

La cantidad de folato ingerido en la dieta es determinante, en muchos casos, de una mejor o peor respuesta a 5-FU. Puesto que la Timidilato Sintasa es una enzima limitante en la ruta de síntesis del folato, y es, a su vez, la diana principal sobre la que actúa el 5-FU, es importante que los pacientes lleven una dieta rica en folato durante el tratamiento, con el fin de no deplecionar la cantidad de folato circulante, imprescindible en otros procesos como la metilación del ADN (Paz et al., 2004). Además, la depleción de folato incrementa los niveles de TS de 2 a 3 veces (Van der Wilt et al., 2001).

4.2.3. Estudio de interacción entre las distintas variables clinicopatológicas y polimorfismos presentes en tumores colorrectales

Los factores edad, sexo, variantes genéticas comunes y dieta han sido señalados como grandes influyentes en el metabolismo sistémico y también en el de grupos metilo. Este hecho tiene importantes implicaciones para la predicción de toxicidad y respuesta a 5-FU. Es destacable la observación de que todos los pacientes que presentaban tumores en estadio C-D de Duke eran mayores de 45 años ($p=0.0166$), por lo que se confirmaría la propuesta de algunos investigadores de que el diagnóstico suele verse retrasado por lo poco común que resulta esta enfermedad en la juventud (Pitluk et al., 1976). La edad también es un factor a tener en cuenta cuando se analiza el estado de metilación del genoma. En esta población, el número de islas CpG metiladas en pacientes menores de 45 años era menor de 2/11 o del 18% de las islas consideradas ($p=0.0141$) (Figura 57); lo que parece corroborar la hipótesis general de que el envejecimiento celular favorece la hipometilación global del genoma y la hipermetilación de islas CpG en promotores y regiones reguladoras (Brandelis, 1994, Klein 1991, Macleod 1984).

Uno de los factores que influyen en el estadio del tumor es la localización del mismo, ya que el 65.9% (test Fisher p -value=0.0493) de los pacientes con tumores de colon en el lado izquierdo (colon descendente o distal) presentaban Estadios A-B de Duke. Sin embargo, cuando se realizó el ANOVA de dos vías para comprobar si esta relación entre lateralidad y estadio estaba sesgada por las variables género o edad, no se apreciaron diferencias significativas ($p=0.3413$). Por lo que, según los datos de este estudio, no parece existir tendencia ni relación entre la localización del tumor y la edad o el sexo del individuo.

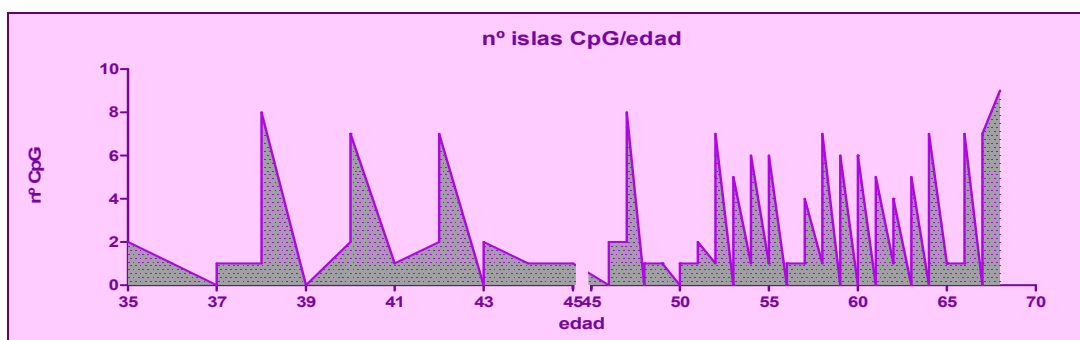


Figura 57: Número de islas CpG hipermetiladas en el tumor atendiendo a la edad del paciente. Se observa que la cantidad de hipermetilación se dilata a medida que aumenta la edad del paciente, sobre todo a partir de los 45 años.

Merece la pena destacar que el 82% de los pacientes con tumores en estadios A-B de Duke seguían una dieta de bajo riesgo (rica en folatos y baja ingesta de alcohol) (Fisher test, $p=0.0052$), frente al 53.6% de pacientes con dieta pobre en folatos, cuyos tumores estaban principalmente en estadio C-D de Duke (Fisher test, $p=0.0013$). Este hallazgo combina la posibilidad de que la dieta antes de la enfermedad sea un factor de riesgo de padecer cáncer colorrectal, con la posibilidad de que, en el momento del tratamiento, sea un factor no sólo predictivo para el tipo de respuesta al mismo y pronóstico de la evolución a estadios más avanzados, sino también diagnóstico del tipo tumoral por estadio. Algunos estudios apuntan que tanto los niveles globales de 5mC del ADN como la inestabilidad cromosómica podrían verse modificadas por una ingesta insuficiente en folatos (Kim et al., 1997), necesarios para conservar el patrón de metilación celular y, consecuentemente, la estabilidad genómica.

Al analizar detenidamente el estadio de cada tumor, se obtuvo que el 93% de los pacientes con tumores en estadio C-D de Duke no respondían al tratamiento con 5-FU (Fisher test, $p<0.0001$) frente a un 47% de aquellos en estadios más tempranos (Figura 58A). Asimismo, estos pacientes con tumores en estadios avanzados sufrían mayor toxicidad debida al tratamiento ($p=0.0044$) (Figura 58 B).

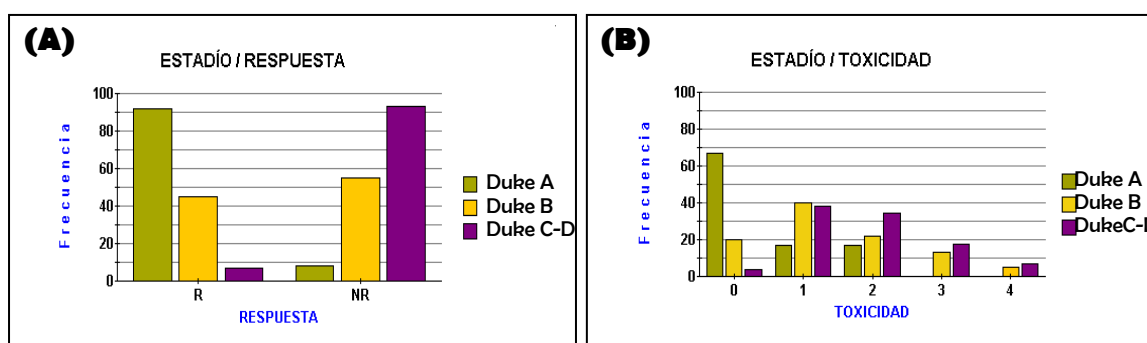
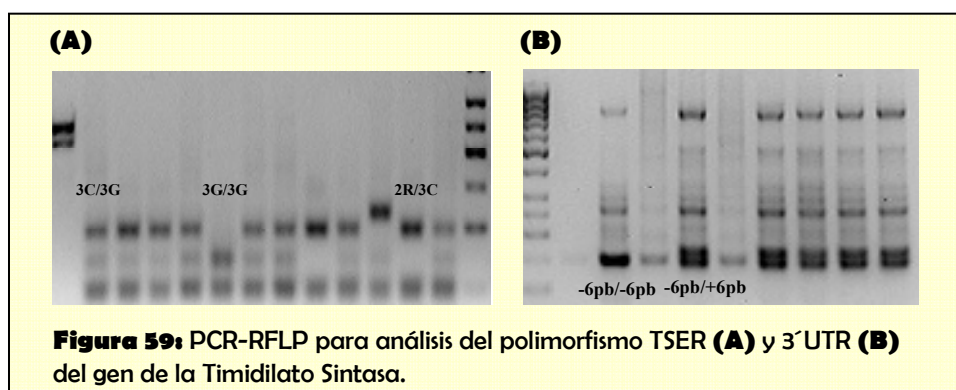


Figura 58. (A) Frecuencia de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con 5-FU cuyos tumores presentaban estadios A, B y C-D de Duke. **(B)** Grado de toxicidad tras el tratamiento en pacientes en los distintos estadios de Duke. R: Respondedores. NR: No respondedores

4.2.3.1. Influencia de los polimorfismos génicos y sus interacciones en las características clinicopatológicas del tumor

4.2.3.1.1. Análisis de polimorfismos en genes que participan en la ruta metabólica del 5-FU (TSER y T β -3'UTR) en la población de tumores

De las 101 muestras de tejido tumoral analizadas, el genotipado para los polimorfismos del promotor de *TYMS* (TSER) dio como resultado un 27.72% (28 de 101) de pacientes con genotipo 2R/3C, el 30.69% (31 de 101) 3C/3C, 15.84% (16 de 101) tenían haplotipo homocigoto 2R, el 7.92% (8 de 101) tenían haplotipo homocigoto 3G, el 15.84% (16 de 101) tenía haplotipo 2R/3G y el 1.98% (2 de 101) tenía haplotipo 3C/3G (Figura 59A). La variante 3G es muy poco frecuente y cuando aparece lo hace fundamentalmente de forma homocigótica, mientras que se presenta ocasionalmente con 2R y rara vez con 3C. Estas distribuciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, pero diferían bastante de las encontradas en líneas celulares. Dado que la población de líneas celulares analizadas para este polimorfismo era muy limitada, no es raro encontrar diferencias en la distribución de los polimorfismos entre líneas celulares y pacientes, ya que sólo hubo una línea celular portadora del alelo 3G de un total de 17 líneas analizadas, mientras que aproximadamente una cuarta parte de la población de pacientes eran portadores de este alelo.



Para el polimorfismo de delección de 6pb en el extremo 3'UTR del gen de la Timidilato Sintasa, se obtuvieron 63.37% (64 de 101) tumores homocigotos y 36.63% (37 de 101) que presentaban una sola copia de la delección. No se halló ningún paciente homocigoto -6pb/-6pb (Figura 59B).

a. Asociación entre variantes genéticas de *TYMS* presentes en el tejido tumoral y características clinicopatológicas del mismo

La Timidilato Sintasa cataliza la metilación reductiva de dUMP por 5,10-methylenetetrahydrofolate para formar dTNP. Esta reacción es crítica para la correcta proliferación celular. Los dos polimorfismos presentes en el promotor (VNTR*2/3 Y SNP C/G) afectan a los niveles de transcripción de esta enzima, de manera que cuando está presente el alelo 3G los niveles de ARNm son hasta 4 veces superiores (Horie et al., 1995). TS es la principal diana sobre la que actúa el 5-Fluorouracilo, que forma un complejo ternario mediado por el sustrato de *MTHFR*, el 5,10-MTHF, que bloquea la acción de la enzima e inhibe la síntesis de ADN (Danenberget al., 1977).

No sin una gran controversia, desde hace algunos años, se ha asociado el polimorfismo 3G en el promotor de la Timidilato Sintetasa con una respuesta pobre a tratamientos quimioterapéuticos basados en 5-FU. El motivo no es otro que la expresión de esta enzima en el tejido tumoral. Algunos autores han comprobado que el alelo 3G produce una expresión a nivel de ARNm de *TYMS* hasta cuatro veces superior al alelo 2R (Huang et al., 2000, Nishimura et al., 1999, Salonga et al., 2000, Heh et al., 1998).

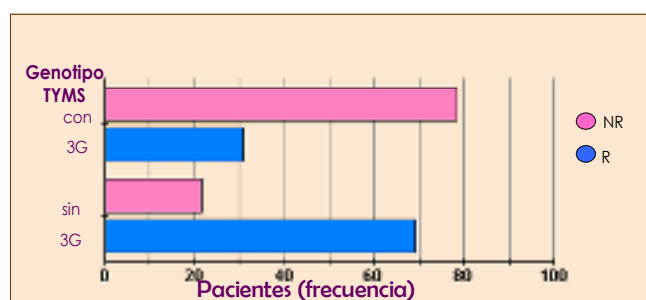


Figura 60: Frecuencia del alelo 3G en pacientes respondedores y no respondedores. El alelo TSER*3G se asocia con una mala respuesta al tratamiento basado en 5-FU (χ^2 test; $p=0.0001$)

En nuestra población de análisis, todos los pacientes portadores del alelo 3G, respondían mal al tratamiento con 5-FU (Figura 60 y 61; Tabla 17) y presentaban un nivel de toxicidad significativamente alto (Fisher test, $p<0.0001$), como ya se había descrito previamente (Marcuello et al., 2004). Por el contrario, el 89.3% de aquellos pacientes que no tenían el alelo 3G, no alcanzaban niveles de toxicidad mayores de 2 (Fisher test, $p=0.0159$) (Figura 61), lo que confirma los datos publicados.

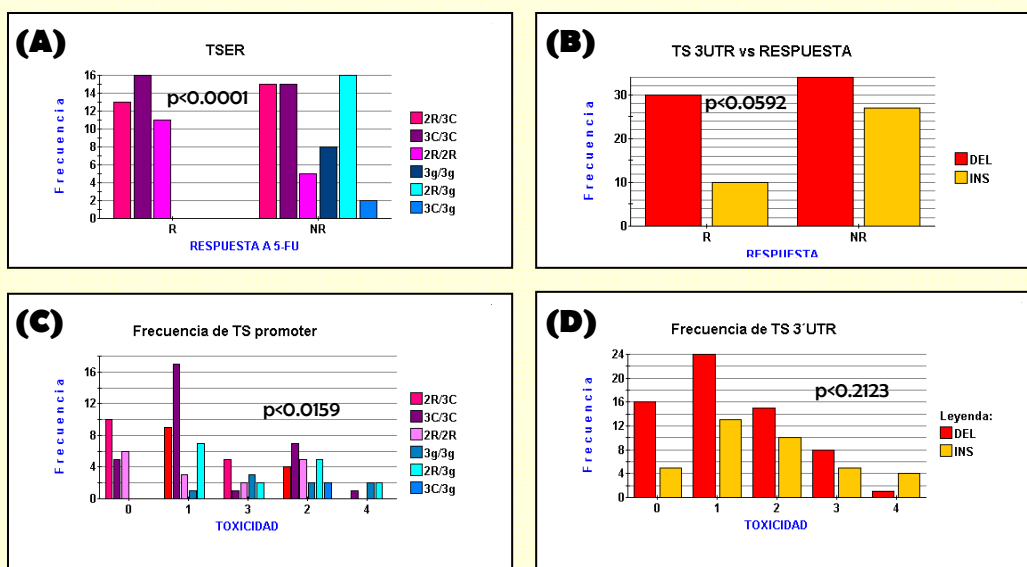


Figura 61: Frecuencia de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con 5-FU teniendo en cuenta el genotipo para el polimorfismo en el promotor de *TYMS* (A) o en el extremo 3'UTR (B). Grado de toxicidad que presentaban los pacientes con los distintos genotipos para el polimorfismo TSER (C), o 3'UTR (D). R: Respondedores. NR: No respondedores. DEL: alelo *TYMS* 3'UTR deleciónado (-6pb), INS: alelo normal sin deleción de 6pb (+6pb). Se observa que los portadores del alelo 3G no respondían a la terapia basada en 5-FU y presentaban mayor grado de toxicidad (según el criterio de la OMS). Lo mismo ocurre con el alelo deleciónado -6pb en el extremo 3'UTR del gen de *TYMS*.

En cuanto al polimorfismo en el extremo 3'UTR de la enzima TS, se vio que el 72% de los pacientes que presentaban el alelo normal +6pb, tenían cierta tendencia a desarrollar tumores resistentes al tratamiento (Fisher test, $p=0.0592$) y peor tolerancia al mismo (Fisher test, $p=0.2123$) (Figura 61) (Tabla 17). Esta tendencia es coherente con el hallazgo de un 83% de los tumores en estadios A-B de Duke portadores del alelo deleciónado ($p=0.0029$), mientras que no se encontró esta correlación en los estadios más avanzados. Aunque en general en la población de tumores es mucho más frecuente el alelo variante (-6pb) que el normal (+6pb) (64% vs 36%), también lo es en la población normal con la misma frecuencia (64% vs 36%). Parece que el alelo variante, además, se asocia con tumores menos agresivos. La inestabilidad en el ARNm que genera la deleción de ese pequeño fragmento de 6pb se traduce en niveles reducidos de la enzima TS y se asocia con una menor progresión tumoral (Mandola et al., 2004).

Haplotipo	Respondedores	No Respondedores	OR	95% CI	p-valor
3IN 3G	41	44	1		
CON 3G	0	17	Inf.	0-inf.	0.0002
DEL (-6pb)	31	34	1		
IN\$ (+6pb)	10	28	2.55	1.07-6.09	0.0325

Tabla 17: Test χ^2 , IC:95%. Relación de alelotipos para los distintos polimorfismos del gen TS relacionados con el tipo de respuesta a 5-FU. Se observa una fuerte asociación entre los alelos 3G y +6pb con una peor respuesta al tratamiento.

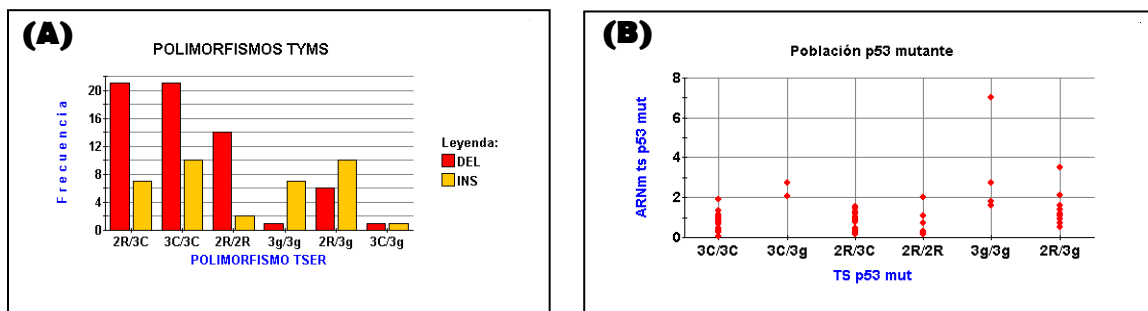


Figura 62. (A) Asociación entre los distintos polimorfismos del gen *TYMS* en tumores. Se observa que el alelo DEL(-6pb) en 3'UTR, aparece mayoritariamente cuando no está presente el alelo 3G. **(B)** Análisis de expresión de TS según el genotipo TSER en la subpoblación de pacientes p53 mutantes. La expresión de TS es mayor en tumores con una copia del alelo 3G y se incrementa si hay dos copias.

Aquellos tumores cuyo genotipo TSER no presentaba el alelo 3G, eran frecuentemente portadores del alelo deleciónado -6pb del extremo 3'UTR (χ^2 test, $p=0.0015$) (Figura 62). Además, ambos polimorfismos parecían estar en *desequilibrio de ligamiento* (p -valor=0.0025), mostrando efectos más severos cuando presentaban el haplotipo 3G/+6pb (Tabla 18). En el análisis realizado sobre un panel de 17 líneas celulares, encontramos resultados coincidentes, es decir, aparecían asociados los alelos 2R y -6pb. Estos resultados son contrarios a los que obtuvieron *Nief y colaboradores* en el panel de líneas celulares NCI-60, en el que el alelo 3G se asociaba significativamente con la deleción de 6pb y el alelo 2R con la inserción. Pero en ese mismo estudio indican que la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 18p, donde se encuentra el locus de *TYMS*, es bastante común en cáncer colorrectal. En esta afirmación podría residir la disparidad encontrada en nuestra población.

En nuestra población de pacientes encontramos relación entre los polimorfismos de *TYMS* y la toxicidad al tratamiento. Estos resultados discrepan con algunas publicaciones, donde no han conseguido establecer dicha asociación en líneas celulares establecidas de cáncer humano (Nief et al., 2007). Puesto que la toxicidad en pacientes y la citotoxicidad *in vitro* son distintas, no se pueden trasladar los resultados de los cultivos celulares a los pacientes con cáncer de colon. De hecho, en nuestros ensayos con líneas celulares no pudimos establecer asociación entre la presencia del alelo 3G de *TYMS* y la citotoxicidad porque este alelo se encontraba en un porcentaje muy reducido y no era representativo.

Puesto que muchas líneas celulares tienen *p53* mutado, realizamos un análisis de la expresión de *TYMS* en la subpoblación *p53* mutante en las muestras de pacientes. Comprobamos que la expresión de *TYMS* se incrementaba proporcionalmente al número de copias del alelo 3G (ANOVA, $p=0.0003$) (Figura 62B). Estos datos correlacionaban con el subanálisis realizado anteriormente en líneas celulares del panel NCI-60 comparando la expresión de *TYMS* con su genotipo, en el que encontraron una asociación significativa entre el alelo 3G y la sobreexpresión de la enzima que resultaba en una actividad enzimática 6 veces superior a la de los demás genotipos (Nief et al., 2007). En nuestra población de líneas

celulares no se pudo establecer significancia por falta de líneas portadoras del alelo 3G, por lo que se ampliará el tamaño muestral y se comprobará la existencia de esta relación.

Incluso tras la obtención de estos resultados, aún permanece sin determinar si existe un efecto sinérgico de los polimorfismos de *TYMS* en relación con la respuesta al tratamiento basado en 5-FU. A pesar de ello, *TYMS* sí tiene un papel claro en la respuesta a 5-FU. Los datos sugieren que los polimorfismos en el promotor (VNTR y SNP) y la inserción en el extremo 3'UTR del gen *TYMS*, pueden estar asociados con resistencia a quimioterapia basada en 5-FU/oxaliplatino en el tratamiento adyuvante como ha sido descrito previamente (Salonga et al., 2000, Marcuello et al., 2004).

Haplotipo	Respondedores	No Respondedores	OR	95% CI	p-valor
2R/DEL	16	12	1.00		
2R/INS*	2.5	8	3.56	0.78-16.31	0.931
3C/DEL	15	17	1.00		
3C/INS*	7.5	7	0.77	0.23-2.64	0.6797
3G/DEL	0	4.5	Inf.	0.00-inf	0.0730
3G/INS*	0	12.5	Inf.	0.00-inf	0.0025

Tabla 18: Test χ^2 , IC:95%. Relación de haplotipos para los distintos polimorfismos del gen *TYMS*. Se observa desequilibrio de ligamiento entre el polimorfismo SNP del promotor y la inserción en el extremo 3'UTR. *INS: genotipo normal TS-3'UTR (+6pb).

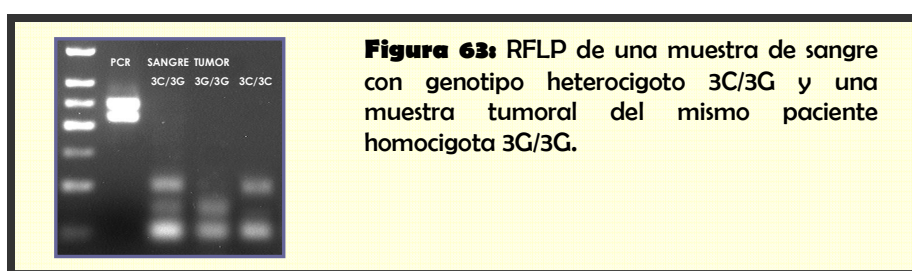
b. Comparación de las variantes genéticas encontradas en tejido tumoral y su correspondiente tejido sano (línea germinal)

En los casos en que se contaba con muestra de tejido normal para comparar con el tumoral, se estudiaron los polimorfismos de *TYMS* a fin de evaluar la capacidad mutacional de los tumores conforme avanza la enfermedad. El fin último de esta comparación responde a la determinación de una posible firma molecular de respuesta al tratamiento de fácil implementación en la práctica clínica, como correspondería al análisis potencial de determinados marcadores en tejido sano del paciente de fácil acceso en consulta. El análisis de marcadores putativamente relacionados con la sensibilidad/resistencia al tratamiento en sangre periférica, mejoraría la viabilidad y factibilidad de estas determinaciones, con menores molestias para el paciente. Previamente se publicaron artículos en los que se demostraba que el cromosoma 18, donde se localiza el locus del gen *TYMS*, sufría deleciones de algunas regiones, ocasionando pérdidas de heterocigosidad (LOH) (Nief et al., 2007). En algunos casos de los estudiados, concretamente en un 3%, encontramos que el locus TS estaba delecionado, ya que no amplificaba ninguno de los dos fragmentos analizados (TSER y 3'UTR). Sería

interesante hacer una tinción *FISH* (*Fluorescence in situ hybridization*: Hibridación *in situ* fluorescente) o análisis de microsatélites mediante PCR, para comprobar qué región se ha perdido.

Merece especial atención el hecho curioso de un pequeño número de casos, en los que tuvo lugar una reversión del SNP 3C a 3G en el tumor con respecto a la línea germinal (Figura 63), lo que generaba un tumor resistente a la quimioterapia basada en 5-FU en un paciente que en principio era sensible. Aunque no es un resultado estadísticamente significativo, sí es un dato que debe tenerse en cuenta a la hora de realizar un algoritmo pronóstico de respuesta a 5-FU. Si el genotipo de la línea germinal puede resultar modificado en el tejido tumoral, es posible que el análisis de polimorfismos en ADN procedente de sangre periférica proporcione falsos negativos, de manera que el tejido normal sea sensible a la terapia y el tumor, en cambio, no responda al tratamiento. Este dato es fundamental puesto que los efectos secundarios adversos debidos a la terapia serían innecesarios y se ganaría tiempo en la detención del avance tumoral. Por tanto, el análisis genotípico previo al tratamiento no sólo debe hacerse en línea germinal, sino que sería óptimo tomar una biopsia de tejido tumoral siempre que sea accesible en los casos en los que la línea germinal se asocie a una mayor probabilidad de respuesta a terapia.

No obstante, el caso contrario no se ha observado en ninguna muestra, es decir, la reversión en el tumor del genotipo 3G a 3C. Este supuesto correspondería según nuestros datos a un tumor más sensible a la terapia. Por este motivo, y en el supuesto de analizar el polimorfismo como marcador de respuesta al tratamiento en sangre periférica, los casos que mostrasen un genotipo asociado a resistencia en línea germinal 3G/3G, podrían ser seleccionados de entrada para un tratamiento alternativo, pues con una mayor probabilidad manifestarán mayor toxicidad y resistencia al tratamiento con 5FU.

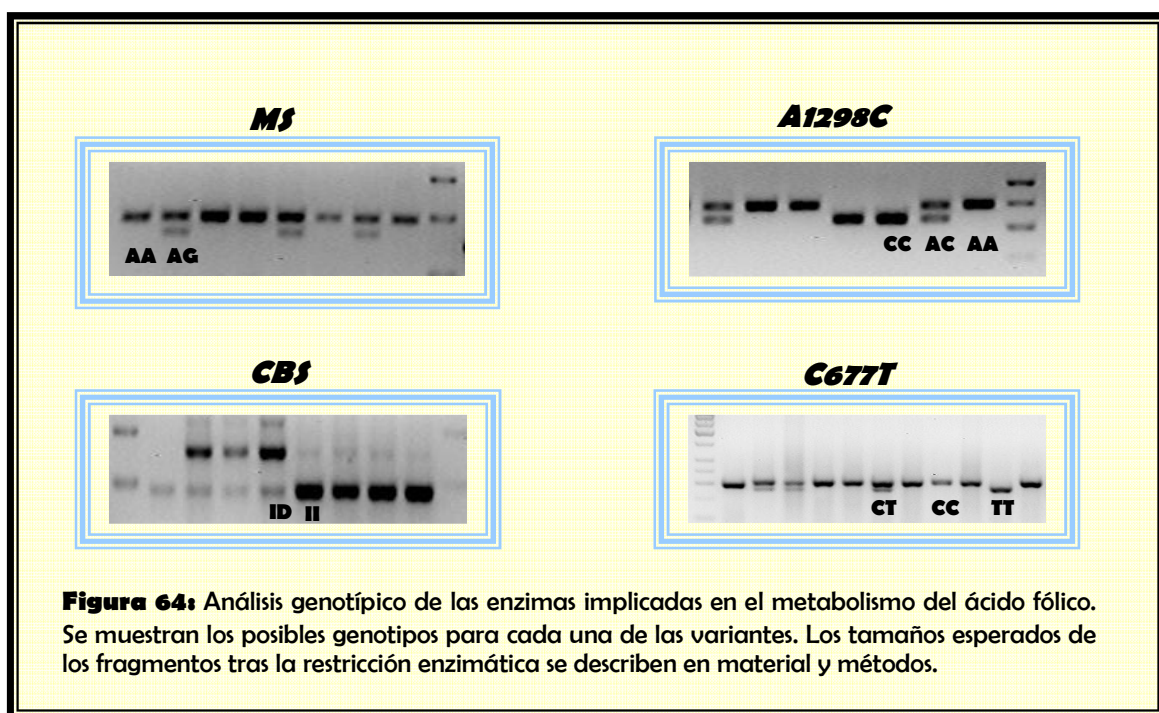


4.2.3.1.2. Análisis de polimorfismos en genes que participan en la ruta metabólica del grupo metilo (*MTHFR*, *M5* y *CBS*) en la población de tumores

Planteamos un estudio paralelo a la respuesta a quimioterapia basada en 5-FU con el fin de obtener información acerca de las características inherentes a los tumores

colorrectales. Para ello, se analizaron los polimorfismos genéticos presentes en los genes de la ruta metabólica del grupo metilo y ácido fólico en la población de tumores. En los casos en que se contaba con tejido normal, se realizó idéntico análisis para determinar el genotipo en línea germinal y evaluar la capacidad metabólica del tumor en comparación con ésta. Con estos análisis, pretendíamos hallar un modo de caracterización del tumor para decretar el tratamiento más adecuado en cada individuo. El fin último perseguiría la validación de los posibles marcadores de respuesta determinados en tejido tumoral, en tejido sano o línea germinal del paciente. De este modo, se trataría de consolidar una posible firma molecular de respuesta a tratamiento en tejidos de más fácil acceso, como sangre periférica, y por ello, más factible a la hora de implementarlo en la práctica clínica rutinaria.

Sabemos que los polimorfismos más comunes en los genes del metabolismo de grupos metilo suponen una disminución de la eficiencia enzimática, por lo que genotipamos cada uno de los tejidos tumorales en aras de asociarlo posteriormente con el resto de parámetros implicados en la respuesta y toxicidad producidas por la droga tal y como se describe en material y métodos (Figura 64).



Para el polimorfismo *MTHFR-C677T*, el 46.4% (66 de 143) de los pacientes analizados fueron homocigotos CC, el 38.6% (55 de 143) de los pacientes fueron heterocigotos CT, y el 15% (22 de 143) fueron homocigotos TT. Del polimorfismo *MTHFR-A1298C*, un 48.5% (70 de 143) de los pacientes estudiados fueron homocigotos AA, un 38.5% (55 de 143) fueron heterocigotos AC y un 13% (18 de 143) de los pacientes fueron homocigotos CC. El análisis del polimorfismo *MS-A2756G* reveló un 78% (111 de 143) de pacientes homocigotos AA y un 22% (32 de 143) de heterocigotos AG. No hubo ningún paciente homocigoto para el alelo variante 2756GG (Figura 64), lo que resulta coherente con los estudios publicados en la bibliografía (Ma et al.,

1999). Con respecto a la variante de la inserción de 68pb del gen *CBS*, el 75.3% (108 de 143) de los pacientes fueron homocigotos para la ausencia de inserción, el 22.8% (33 de 143) fueron heterocigotos y un 1.9% (2 de 143) presentaban la inserción de forma homocigota. Todas las distribuciones estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg y concordaban con las frecuencias publicadas en estudios anteriores (Sharma et al., 2008).

4.2.3.1.2.1. Asociación entre variantes genéticas de *MTHFR* presentes en el tejido tumoral y características clinicopatológicas del mismo

El 65.12% de los pacientes con tumores en el lado izquierdo presentaban el alelo silvestre 677C en el gen *MTHFR* (Fisher test, $p=0.0288$) (Figura 65). Este alelo se asocia con una actividad enzimática normal que permite el correcto funcionamiento de la ruta metabólica del grupo metilo. En estos tumores, como cabía esperar, no se observó hipometilación global ni acumulación de homocisteína. Este dato apoya el resultado obtenido que ratifica un mejor pronóstico para los tumores localizados en colon izquierdo.

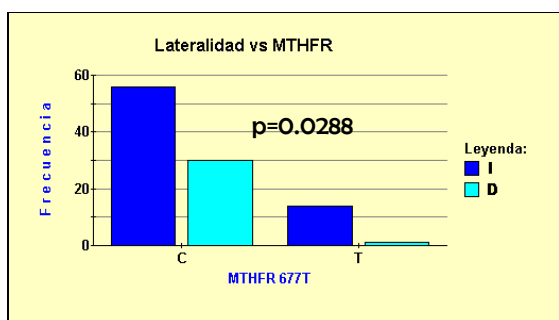
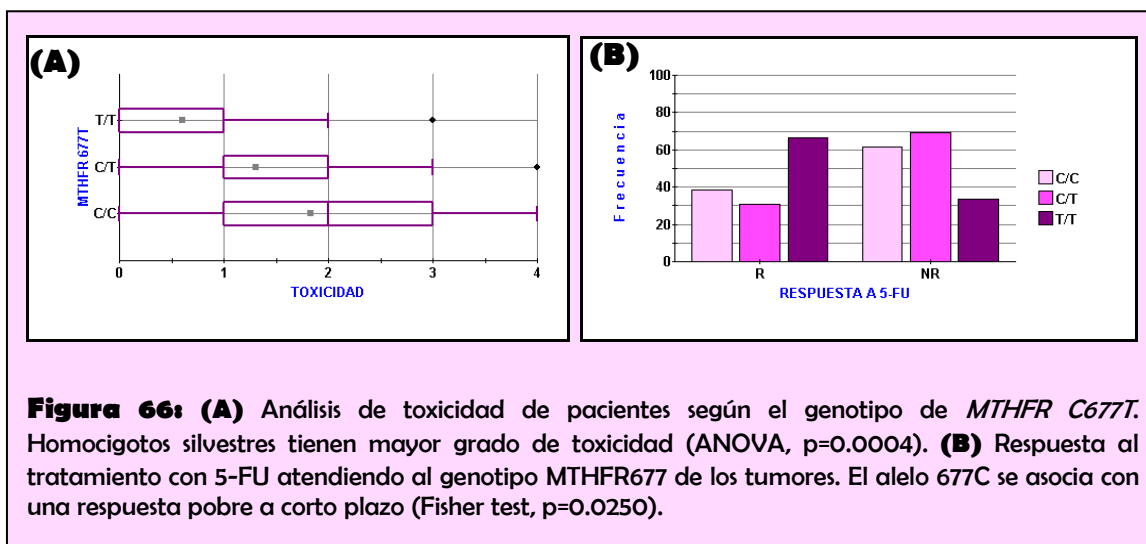


Figura 65: Lateralidad del tumor en relación con la presencia del alelo variante 677T de *MTHFR*. I: Izquierdo, D: Derecho, C: 677C, T: 677T.

Por otro lado, los pacientes homocigotos *silvestres* 677CC presentan mayor grado de toxicidad debido al tratamiento que el resto de pacientes (Fisher test, $p=0.0005$) (Figura 66A). Asimismo, el 65% de los tumores con el alelo normal 677C, tanto en homocigosis como heterocigosis, no mostraba respuesta al tratamiento con 5-FU ($p=0.0202$) (Figura 66B) y manifestaban menor tolerancia que los dobles mutantes 677TT (Fisher test, $p=0.0250$). En cambio, no se observaron diferencias significativas entre homocigotos *silvestres* y heterocigotos. Los portadores del alelo 677T mostraban acumulación de homocisteína tóxica en sangre (Wilcoxon test, $p=0.0003$) y menor cantidad de folato circulante (Wilcoxon test, $p=0.0010$). Parece que la relación inversa entre el alelo mutante 677T y el cáncer colorrectal debida a una acumulación de folato en los pacientes con genotipo doble mutante 677TT (Le Marchand et al., 2005), se limita a estadios avanzados de la enfermedad ($p\text{-value}=0.04$. OR: 0.88 (95% IC: 0.58-1.33) vs OR: 0.52 (95% IC: 0.32-0.85), por lo que sería conveniente ampliar el tamaño muestral.

Aquellos tumores portadores del alelo *silvestre* en el polimorfismo *MTHFR 1298A*, presentaban gran toxicidad después del tratamiento (Fisher test, $p=0.0227$). Puesto que el

alelo silvestre 1298A permite la correcta actividad enzimática, nos llevó a pensar que dicha toxicidad podía deberse al aumento de los niveles de homocisteína en sangre. Sin embargo, la cuantificación de los niveles de folato y homocisteína no manifestó diferencias significativas con respecto al alelo variante (Wilcoxon test, $p=0,5891$ y $p=0,0558$ respectivamente).



Indudablemente, la disminución en la actividad de la enzima MTHFR facilita la acumulación de su sustrato, cofactor necesario para la actividad de la droga sobre su principal diana, la Timidilato Sintetasa, por lo que los polimorfismos en este gen podrían favorecer la acción del 5-FU.

Paralelamente, el 71.4% de los tumores distales presentaban la mutación A2756G en el gen de la Metionina Sintasa (Fisher test, $p=0.013$), responsable de la cosíntesis de Metionina y posteriormente SAM (S-Adenosilmetionina, donador universal de grupos metilo) a partir de Homocisteína. Esta enzima utiliza el grupo metilo del folato circulante para esta reacción, por tanto, el polimorfismo causante de una disfuncionalidad enzimática favorecería la acumulación de folato circulante y la hipometilación global del genoma e hipermetilación local de algunos promotores (Paz et al., 2002). Dado que los tumores distales son frecuentemente de estadio bajo, se cumpliría la afirmación anterior en que la relación inversa entre 677T y cáncer colorrectal no se produce en estadios tempranos. No obstante, en esta población no había ningún tumor homocigoto para la mutación *MS-2756GG*, dato consistente con publicaciones previas en otros grupos poblacionales (Paz et al., 2002). Por ende, parece necesaria la existencia de las dos copias mutantes para encontrar una asociación significativa con la hipometilación global del genoma, a diferencia la depleción de folato, consecuencia de la variante 677T (Wilcoxon test, $p=0,0010$). Por otra parte, el gen de la Metionina Sintasa tiene una relación con el grado de toxicidad similar a la del alelo A1298C

de *MTHFR*, es decir, que los pacientes que mejor toleran el tratamiento son los homocigotos silvestres ($p=0.0202$). Estos resultados son coherentes con el hecho de que la disfuncionalidad de este gen origina acumulación de homocisteína tóxica en el torrente sanguíneo, lo que induciría mala tolerancia al fármaco, aunque en nuestra población de estudio, la regresión lineal no permitió establecer una asociación significativa entre los niveles de homocisteína plasmática en los pacientes y el grado o tipo de toxicidad producido por la droga (p -valor=0.2003). Hay que señalar, sin embargo, que el tamaño muestral de este subestudio fue de 31 pacientes, y debería ampliarse para mayor fiabilidad.

4.2.3.1.2. Análisis del estado de *p53*

Puesto que en la respuesta al tratamiento intervienen múltiples factores, debemos destacar que aproximadamente el 56% de los tumores en estadio A-B presentaban el genotipo silvestre del gen *p53* (Fisher test, $p=0.0131$), lo que facilitaría la entrada de la célula maligna en apoptosis. Mientras, el 72.4% de los tumores en estadios C-D presentaban *p53* mutado (Fisher test, $p=0.0151$). Además, la proteína TP53 *wild-type* puede modular directamente la expresión de TS (Lee et al., 1997), a través de la interceptación de algunos factores de transcripción que regulan positivamente la actividad del promotor de este gen. Este proceso dificultaría el avance de la enfermedad. Los tumores con *p53* mutado, por tanto, seguirían el proceso hacia estadios más avanzados. En favor de esta hipótesis, también se observó que el 81% de los pacientes con *p53* mutado no respondían al tratamiento con 5-FU (Fisher test, $p<0.0001$). No se encontraron, sin embargo, asociaciones significativas entre tolerancia a 5-FU y estado de *p53*.

4.2.3.1.3. Análisis de polimorfismos en genes de reparación del ADN y genes detoxificantes

Los tumores colorrectales pueden sufrir modificación de las dianas celulares o alteración de las rutas de reparación del ADN, lo que les confiere una resistencia intrínseca a drogas quimioterapéuticas (Plasencia et al., 2000). Adicionalmente, esta resistencia puede ser adquirida en tumores que inicialmente eran sensibles y obtienen nuevas características durante el tratamiento (Longley et al., 2005). Por ello, realizamos un análisis de los polimorfismos presentes en los genes de reparación de las rutas NER y BER y en el gen detoxificante *GSTP1*, y cotejamos los resultados obtenidos en línea germinal (sangre periférica) y tejido tumoral (Tabla 19).

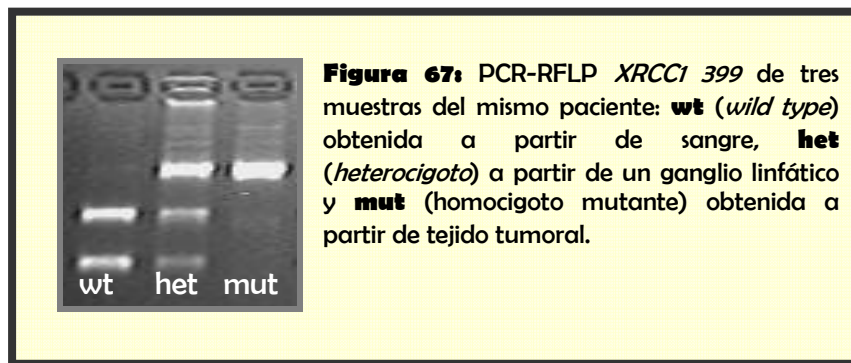
		PACIENTES	TUMORES
GSTP1	WT	50%	46,7%
	Het	39%	43,3%
	MUT	11%	10,0%
XPD 751	WT	52%	40,0%
	Het	36%	60,0%
	MUT	11%	0,0%
XPD 199	WT	98%	98%
	Het	2%	2%
	MUT	0%	0%
	D	59%	46,0%
XRCC1 194	WT	91%	91,7%
	Het	7%	8,3%
	MUT	2%	0,0%
XRCC1 399	WT	33%	25,0%
	Het	47%	42,9%
	MUT	20%	32,1%
XRCC3	WT	28%	31,3%
	Het	66%	66,7%
	MUT	6%	2%

Tabla 19: Frecuencias de los diferentes polimorfismos en genes de reparación del ADN. WT: genotipo silvestre, Het: genotipo heterocigoto, MUT: Genotipo mutante. D: Delección homocigota. En general, en tumores hay mayor número de heterocigotos y menos dobles mutantes.

El test de *Kruskal-Wallis* no reveló diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre ambas poblaciones ($p= 0.2379$). Sin embargo, al contrastar cada genotipo tumoral con su correspondiente línea germinal, se encontraron reversiones de mutación en tejido tumoral en los genes de reparación *XRCC1-399* y *XPD751*. Se definió un 7% de casos en los que el tumor y la línea germinal tenían distinto genotipo para *XRCC1-399*. En concreto, se detectó un caso donde el tejido normal (sangre) presentaba genotipo homocigoto normal, un ganglio linfático aislado del meso del mismo paciente presentaba genotipo heterocigoto y el tumor tenía genotipo homocigoto mutante (Figura 67). Tomado de manera superficial, aparentemente podría sugerir una progresión mutacional desde el tejido normal al tumoral, con una selección en este último de la variante más ventajosa para el tumor. Si bien, este resultado podría deberse también a varias alternativas:

- En el ganglio colocalizaban dos poblaciones celulares distintas (homocigota mutante y homocigota silvestre)
- Existe una progresión tumoral con ventaja selectiva de las células mutantes con respecto a las normales
- Se trata de un genotipo primariamente mutante que ha simplificado el tejido periférico normal.

Este paciente presentó una respuesta bastante pobre al tratamiento y alta toxicidad a 5-FU, sobre todo a nivel cutáneo. Con respecto a la evaluación predictiva del tumor en sangre o ganglio, en este caso comprobamos que no sería efectiva, puesto que el genotipo del tejido tumoral es distinto. Por tanto, es preferible realizar una biopsia del tejido tumoral siempre que sea posible para realizar la predicción de respuesta a 5-FU.



4.2.3.2. Interacción entre los distintos polimorfismos

a) Interacción entre los distintos polimorfismos que afectan a genes del metabolismo de grupos metilo

Inicialmente, se comprobó que la población estaba en equilibrio de *Hardy-Weinberg* para cada SNP. Ningún polimorfismo presentaba una distribución significativamente distinta de la esperada, puesto que los p-valor no eran inferiores a 0.05 en ningún caso, por lo que se procedió a estudiar su relación con otros polimorfismos y con otros parámetros como el estado de metilación del ADN, respuesta al tratamiento, toxicidad, etc.

La comparación de los distintos polimorfismos del gen *MTHFR* condujo hacia una asociación significativa entre tumores con genotipo mutante *MTHFR* 677TT y genotipo homocigoto normal o heterocigoto *MTHFR* 1298AA/AC (χ^2 test, $p=0.0071$). El test χ^2 para el estudio de haplotipos, determinó que no existía desequilibrio de ligamiento entre ambos polimorfismos ($p=0.1384$, OR=0.4978, I.C. 95.00% [0.1961, 1.2634]), ya que en la población de estudio se encontraban las cuatro combinaciones posibles en la distribución esperada, descartando la mutación o ausencia de recombinación entre los dos *loci* polimórficos de *MTHFR*. Parece, por tanto, que la asociación entre los alelos 677T y 1298A sólo ocurre cuando ambos se presentan en homocigosis. La comparación entre los haplotipos y el tipo de respuesta a 5-FU de cada tumor, tampoco arrojó resultados estadísticamente significativos y era similar a los de cada genotipo analizado de manera independiente (Tabla 20).

Haplotipo	Fr estimada Respondedores	Fr estimada No Respondedores	OR	95% IC	p-valor
677C/1298 A	19.5	29	1		
677C/1298C	9.5	18.5	1.3	0.96-2.27	0.5784
677T/1298 A	14.5	22.5	1.06	1.45-2.51	0.8992
677T/1298 C	11	11.5	0.75	0.28-2.04	0.5754

Tabla 20: Asociación entre los distintos haplotipos y el tipo de respuesta a quimioterapia basada en 5-FU (test χ^2 , p-valor significativo menor de 0.05), *Odds ratio* tomando como referencia el homocigoto normal. No se observan p-valores significativos de desequilibrio de ligamiento entre ambos loci. Parece que la asociación entre los alelos *MTHFR* 677T mutante y 1298A silvestre sólo ocurre cuando ambos se presentan en homocigosis.

b) Interacción entre los polimorfismos en genes del metabolismo de grupos metilo con los niveles de folato en sangre

Los niveles de folato en sangre se ven modificados, en gran medida, por el genotipo de las enzimas *MTHFR*, *MS* y *CBS*. El 85% de los tumores que presentaban delección en el extremo 3'UTR de *TYMS*, tenían genotipo silvestre para la enzima Metionina Sintasa (Fisher test, $p=0.0440$). La delección de 6pb en el gen *TYMS*, conlleva una inestabilidad del ARNm y consecuentemente, menores niveles enzimáticos. Por otro lado, *MS* transfiere el grupo metilo del folato circulante a la homocisteína para liberar folato y sintetizar metionina y, en última estancia, SAM, donador universal de grupos metilo. Por tanto, esta combinación de polimorfismos favorece que el reservorio de folato de la célula no se vea deplecionado.

c) Interacción entre los polimorfismos en genes del metabolismo de grupos metilo con el estado de metilación de islas CpG en promotores de genes supresores de tumores

La metilación y posterior silenciamiento de *MGMT* (O6- Guanina metiltransferasa) son muy corrientes en cáncer colorrectal en asociación con mutaciones en *K-ras* y *p53* (Esteller et al., 2000-c). Algunos autores sugieren que este estado hipermetilado garantiza la reducción en la recurrencia de la enfermedad tras el tratamiento con quimioterapia (Nagasaka et al., 2003). Además, hay datos que confirman que la metilación de la isla CpG del promotor de *MGMT* se asocia con la resistencia a distintos fármacos como procarbazona y temozolamida (Trivedi et al., 2005).

En la población de estudio, el 68% de estos pacientes homocigotos silvestres para *MS* no presentaban hipermetilación en la isla CpG del promotor de *MGMT* (Fisher test,

$p=0.0268$). Teniendo en cuenta que es un gen reparador del ADN dañado por el fármaco, este genotipo en tumores podría conferir resistencia a la droga puesto que conlleva silenciamiento del gen, si bien no hemos profundizado en este estudio para confirmar o descartar esta posibilidad.

Asimismo, el 87% de los pacientes homocigotos silvestres para *MS* no presentaban *APC* metilado, frente al 13% de heterocigotos ($p=0.0408$). Pero teniendo en cuenta que el 78% de los tumores eran homocigotos normales para *MS*, no se puede concluir que esta relación exista siempre en cáncer de colon. Cabe mencionar que los pacientes con *APC* no metilado eran portadores del alelo -6pb de *TYMS* (Fisher test, $p=0.0372$). Parece que aquellas células con el alelo -6pb de *TYMS* podrían asociarse a un ARNm más inestable, que se traducirá en una expresión protéica reducida (Mandola et al., 2004) y afectará a la fase S del ciclo celular. No obstante, tanto el estado no metilado como el alelo deleciónado de TS son los más frecuentes en la población, por lo que es posible que esta relación no revista importancia.

d) Interacción entre los distintos polimorfismos que afectan al gen de la Timidilato Sintetasa

Aquellos pacientes con genotipo de la Timidilato Sintetasa asociado a resistencia a 5-FU, es decir, los que presentan el alelo 3G, son sensibles al tratamiento con esta droga cuando tienen disminuida la actividad enzimática de MTHFR debido a la mutación C677T. Esto resulta bastante razonable debido a que la disfuncionalidad de la enzima MTHFR favorece la acumulación de su sustrato, que a su vez es el cofactor en la formación del complejo ternario que inhibe a TS.

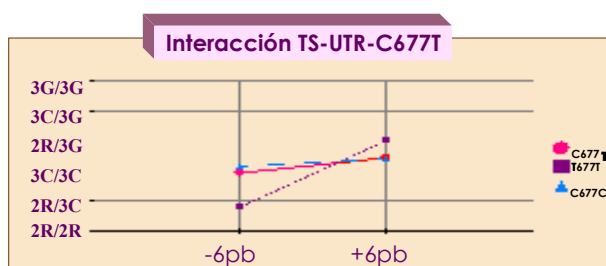
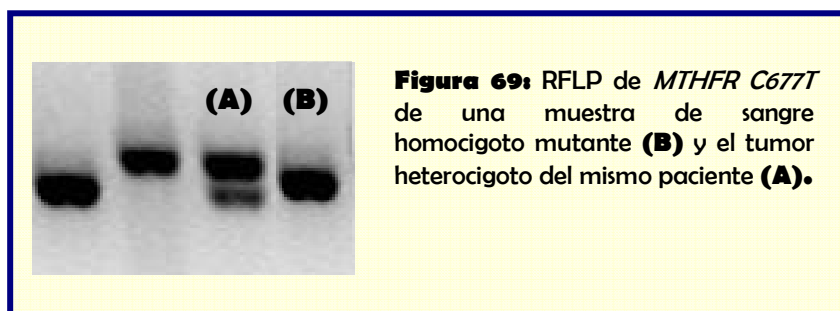


Figura 68: Gráfica de interacción entre los polimorfismos de *TYMS* (*TYMSER* y 3'UTR) y *MTHFR*. Se observa que aparecen conjuntamente con mayor frecuencia los alelos 3G, +6pb y 677T.

Estos resultados están respaldados por el hallazgo de un 17% de casos en que se produjo una reversión de la mutación; es decir, pacientes homocigotos mutantes T677T en la línea germinal, mostraban un genotipo heterocigoto C677T en el tejido tumoral (Figura 69), alcanzando así un fenotipo de resistencia a la terapia en pacientes sensibles.



No se trata de un hecho aislado, sino que tuvo lugar en un gran número de casos. Este porcentaje nos da una idea de la importancia de los genes de la ruta del folato en la carcinogénesis de tumores colorrectales.

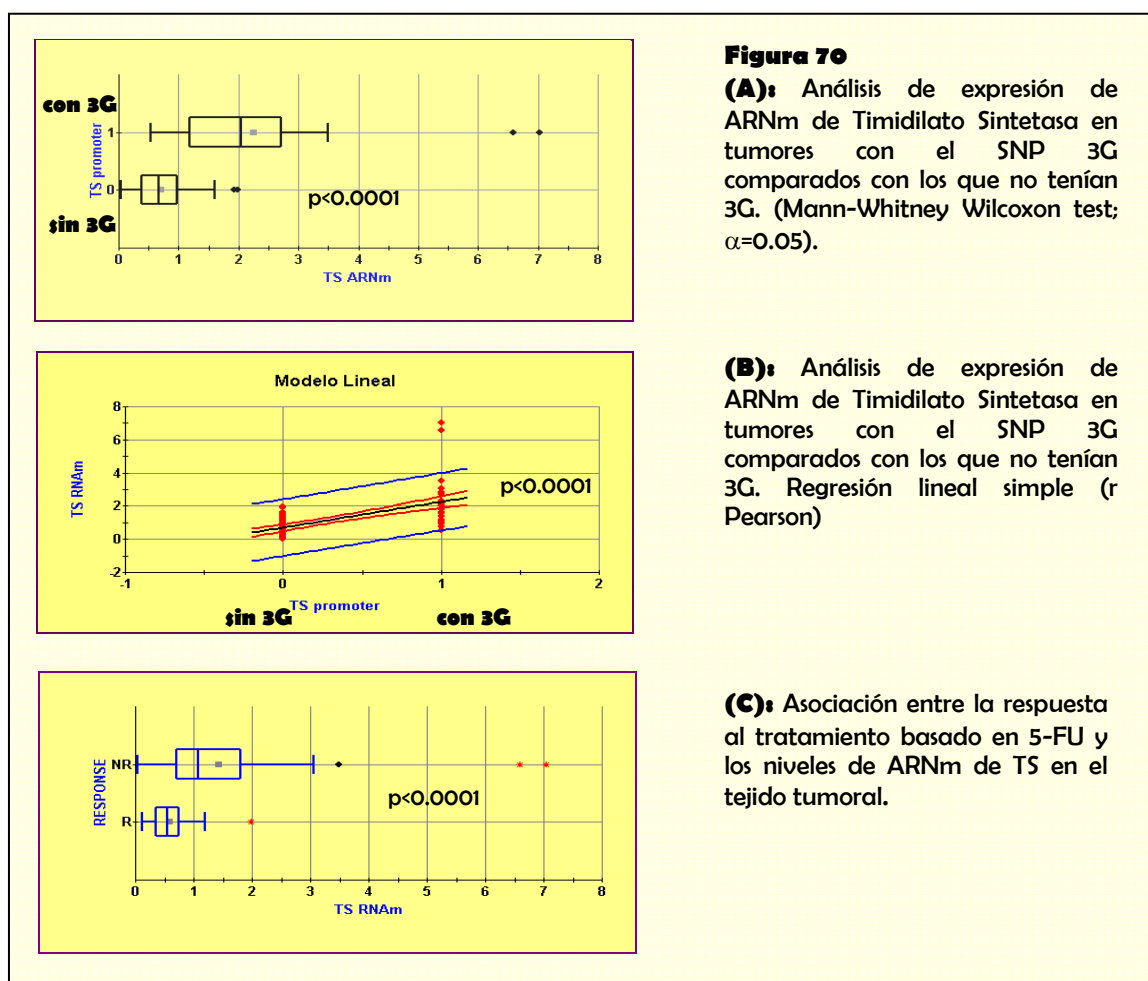
Además, se encontró el mismo fenómeno para otros polimorfismos como el SNP del promotor de *TYMS* o el del gen reparador *XRCC3*. Este hallazgo conlleva una gran relevancia en cuanto a la repercusión sobre un posible algoritmo diagnóstico. Puede dar falsos resultados si únicamente se realiza el análisis en ADN procedente de sangre periférica. Por tanto, es aconsejable la realización de una biopsia tumoral y el genotipado del ADN correspondiente siempre que sea posible.

4.2.4. Análisis de expresión de genes implicados en la ruta metabólica del 5-FU

4.2.4.1. Expresión de ARNm de la Timidilato Sintetasa (*TYMS*) en tumores

Como se ha mencionado anteriormente, existe gran controversia acerca del papel de los polimorfismos localizados en el promotor de la Timidilato Sintasa. Generalmente se ha demostrado una asociación con la sobreexpresión del ARNm de la enzima cuando está presente el alelo con tres repeticiones o el SNP 3G (Horie et al, 1995, Kazuyuki et al., 2001), así como la inserción +6pb (Mandola et al., 2004). Algunos autores ya señalaron que el aumento en los niveles de ARNm de la enzima TS no implicaba necesariamente un aumento en la expresión proteica, puesto que dicha expresión está autorregulada por un mecanismo *feed-back* negativo a nivel de traducción (Takeishi., 1989, Kaneda., 1990, Villafranca et al., 2001). Aun así, puesto que se ha demostrado que muchos polimorfismos se asocian a variaciones en la cantidad de ARNm, analizamos la expresión de *TYMS* mediante qRT-PCR. Los resultados obtenidos demostraban que las muestras portadoras del alelo 3G presentaban valores de ARNm muy superiores a los de las muestras que no lo tenían (Mann-Whitney Wilcoxon test, $p < 0.0001$; regresión lineal, r Pearson= 0.6252; r de Spearman= 0.6257; $p < 0.0001$) (Figura 70A y B). Además, destacó el hecho de que aquellos tumores cuya expresión de ARNm era mayor

de 0.71, no respondían al tratamiento con 5-FU (Mann-Whitney Wilcoxon test, $p<0.0001$) (Figura 70C), lo que explica la asociación entre el alelo 3G y la resistencia a 5-FU de manera bastante plausible. Por lo que encontramos una clara asociación entre el nivel de expresión de *TYMS* y la respuesta a 5-FU. Aunque la relación entre el polimorfismo de *TYMS* y la respuesta a 5-FU se estableció de manera indirecta, nos permite su evaluación de cara a una firma molecular. La expresión debería medirse en el tumor, mientras que el polimorfismo puede medirse en sangre periférica.



4.2.4.2. Expresión de ARNm de la Dihidropirimidina Deshidrogenasa (DPYD) en tumores

DPD es la enzima que cataboliza el 80-90% de la cantidad total de 5-Fluorouracilo administrada. En el presente estudio ningún test estadístico encontró diferencias significativas de expresión de DPD entre hombres y mujeres (chi-cuadrado, Fisher y Mann-Whitney test). Este resultado fue opuesto al que obtuvieron Yamashita y colaboradores. Estos autores llevaron a cabo un estudio con 97 pacientes de cáncer colorrectal (63 hombres y 34 mujeres)

en el que la expresión de DPD en tumores en ambos sexos difería significativamente, siendo más baja en las mujeres (Yamashita et al., 2002). Si se tiene en cuenta que el número de pacientes de nuestro estudio es más extenso, es posible afirmar que el análisis epidemiológico resulta más fiable.

No se han observado diferencias de toxicidad y respuesta que puedan asociarse a los niveles de expresión de ARNm de *DPYD*. No obstante, la cantidad de ARNm de *DPYD* se midió únicamente en el tejido tumoral. Puesto que DPD es una proteína ubicua, de expresión y actividad sistémica, es necesario realizar esta cuantificación en tejido normal, para poder determinar si su actividad en el organismo se asocia con algún tipo de toxicidad particular. Además, algunos autores han confirmado que la disminución de ARNm en tejido tumoral con respecto al tejido normal genera tumores resistentes al tratamiento con 5-FU (Ishikawa et al., 1999).

4.2.5. Análisis del estado de metilación de los tumores colorrectales

4.2.5.1. Perfil de hipermetilación de islas CpG en tumores primarios humanos

Se analizó el estado de metilación de las islas CpG en una muestra de 143 tumores colorrectales por MSP, como se describe en el apartado 3.2 de Material y Métodos. Los genes analizados fueron *p16^{INK}*, *p14^{ARF}*, *MGMT*, *APC*, *hMLH1*, *LKB1*, *CRBP1*, *RARB*, *MINT1*, *MINT2* y *MINT 31*.

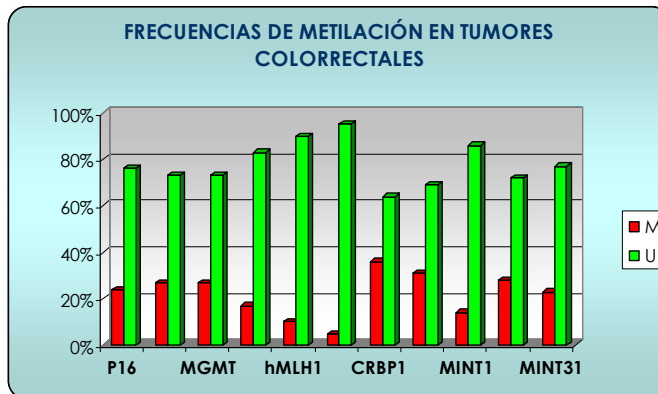
El estado de metilación de islas CpG en los 143 tumores colorrectales se indica en la tabla 21 y figura 71.

Las frecuencias obtenidas en los análisis de metilación de promotores de genes supresores de tumores fueron similares a las publicadas anteriormente (Esteller et al., 1998, Herman et al., 1998)

El porcentaje medio de hipermetilación de islas entre todos los tumores fue del 22%, con la siguiente distribución: el 71% (102 de 143 tumores) tenían menos del 50% de islas CpG hipermetiladas (5 islas CpG hipermetiladas de 11 analizadas), el 17% (24 de 143 tumores) tenían $\geq 50\%$ de islas CpG hipermetiladas (más de 5 islas CpG hipermetiladas de 11 analizadas), y el 12% (17 de 143) de los tumores no presentaron islas CpG hipermetiladas.

		M	U
CICLO CELULAR	p16	24%	76%
	p14	27%	73%
GENES DE REPARACIÓN	MGMT	27%	73%
	APC	17%	83%
	hMLH1	10%	90%
Genes implicados en desarrollo	LKB1	5%	95%
	CRBP1	36%	64%
	RARb	31%	69%
Marcadores de metilación en tumor	MINT1	14%	86%
	MINT2	28%	72%
	MINT31	23%	77%

Tabla 21 y Figura 71: Frecuencias de metilación de los distintos promotores de genes supresores de tumores analizados en tumores colorrectales. M: metilado. U: No metilado. Los genes se muestran en el mismo orden en la tabla y en el histograma (aunque en el histograma se muestran sólo nombres alternos).



4.2.5.2. Frecuencia de metilación de islas CpG en los tumores colorrectales en relación con la respuesta al tratamiento basado en 5-FU

La ruta de acción del 5-Fluorouracilo es, en realidad, una encrucijada metabólica que engloba la ruta de biosíntesis de ADN así como la ruta del folato y del metabolismo de grupos metilo. El 5-FU inhibe a la Timidilato Sintasa (TS), enzima limitante en la síntesis *de novo* del ADN mediante un complejo ternario con la ayuda del cofactor 5,10-MTHF, sustrato de MTHFR. MTHFR cataliza la metilación reductiva de 5,10-MTHF a 5-MTHF. Este último es sustrato de la Metionina Sintasa, quien transfiere el grupo metilo de este folato a la homocisteína, para sintetizar metionina. A su vez, la metionina es el sustrato para sintetizar S-Adenosil metionina, que es el donador universal de grupos metilo necesario para todas las reacciones de metilación que tienen lugar en la célula, y entre ellas la metilación del ADN. Esta red de reacciones implica que, además de los niveles de actividad de TS, diversos elementos del metabolismo de grupos metilo podrían predecir la respuesta a 5-FU en pacientes de cáncer colorrectal. Estos elementos incluyen la actividad de enzimas que participan en el metabolismo del folato, pero también marcadores del metabolismo de grupos metilo, la metilación del ADN y la inestabilidad de microsatélites (Iacopetta., 2006).

El fenotipo metilador (CIMP) viene determinado por el estado hipermetilado de manera aberrante de los promotores de un grupo de genes designados previamente. Los carcinomas colorrectales que presentan supuesto fenotipo metilador CIMP+, están caracterizados por hipermetilación aberrante de las islas CpG de múltiples promotores y resultados clinicopatológicos peculiares como localización proximal, sexo femenino, pobre

diferenciación, MSI, mutaciones en *BRAF* y baja tasa de mutación en *p53* (Toyota et al., 1999; Samowitz et al., 2005; Ogino et al., 2006).

Los tumores considerados CIMP positivos en este estudio son los que tienen al menos dos loci metilados de entre *hMLH1*, *p16*, *p14*, *MGMT*, *MINT1*, *MINT2* y *MINT31*. Planteamos la posibilidad de que existiera alguna relación entre el estado de hipermetilación general de los promotores de genes que caracterizan el fenotipo metilador, y la respuesta de tumores colorrectales al tratamiento de quimioterapia basado en 5-FU/Oxaliplatino. No se observaron correlaciones significativas entre el porcentaje de hipermetilación de islas CpG en promotores de genes supresores de tumores y la respuesta a la droga (Figura 72). No obstante, existía una asociación directa entre un menor porcentaje de hipermetilación de las mencionadas islas CpG en el tumor y la estabilidad de microsatélites. En el transcurso del desarrollo de estos experimentos, se publicaron algunos estudios en carcinoma gástrico que señalaron que existe una asociación significativa entre el estado CIMP negativo del tumor y una mejor respuesta al tratamiento basado en 5-FU/oxaliplatino (Napieralski et al., 2007); mientras que otros investigadores obtuvieron resultados contrarios (An et al., 2005; Kusano et al., 2006). En los estudios de Napieralski y colaboradores (Napieralski et al., 2007) no se analizó el estado de metilación del gen *hMLH1*. La metilación de este gen conlleva inestabilidad de microsatélites, y, en último término según algunos autores, mejor pronóstico y mayor tasa de respuesta a la terapia en tumores gástricos y de colon. Es posible entonces que los resultados de aquel estudio fuesen diferentes en caso de haber incluido *hMLH1* para determinar el porcentaje de hipermetilación de islas CpG.

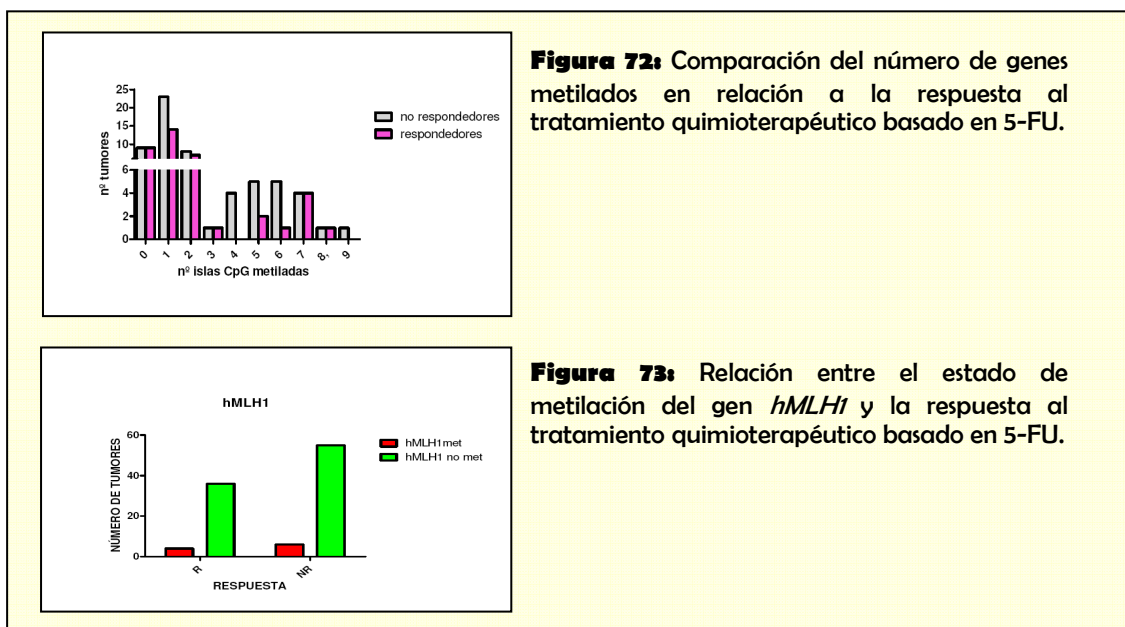


Figura 72: Comparación del número de genes metilados en relación a la respuesta al tratamiento quimioterapéutico basado en 5-FU.

Figura 73: Relación entre el estado de metilación del gen *hMLH1* y la respuesta al tratamiento quimioterapéutico basado en 5-FU.

A raíz de estos antecedentes, comprobamos que aquellos tumores que presentaban hipermetilación del promotor de *hMLH1* en nuestro estudio, tendían a responder mejor al tratamiento, aunque no existía asociación estadística (Figura 73). Se ha descrito que la

inestabilidad de microsatélites se asocia a tumores más agresivos en cuanto a estadio, metástasis, actividad angiogénica etc., pero en la respuesta influyen, como ya hemos comprobado, gran cantidad de factores. Puede que por esa razón no se observe una tendencia clara de respuesta a 5-FU en relación con el estado de metilación de *hMLH1* (Figura 73).

4.2.6. Concordancia en el estado de metilación y asociación con MSI (Microsatellite Instability/Inestabilidad de microsatélites) y MMR (Mismatch Repair /sistema de reparación de apareamientos erróneos)

De los 143 tumores incluidos en este estudio, 84% eran MSI negativo y el 16% MSI positivo, frecuencias que corroboran otras publicaciones en tumores colorrectales (Napieralski et al., 2007; Kim et al., 2005; Chong et al., 1994; Strickler et al., 1994). Por otro lado, se correlacionó significativamente el porcentaje de hipermetilación de islas CpG en el genoma de los tumores con la inestabilidad de microsatélites, de manera que aquellos tumores que presentaban menor frecuencia de promotores hipermetilados, eran habitualmente MSI negativos (Mann Whitney-Wilcoxon test, $p=0.0003$) (Figura 74A).

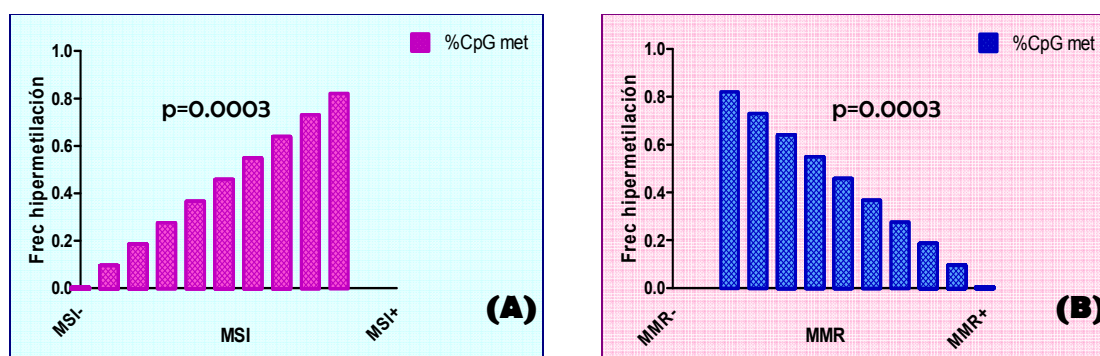


Figura 74: (A) Frecuencia de hipermetilación de islas CpG en tumores con estabilidad (MSI-) e inestabilidad (MSI+) de microsatélites. (B) Frecuencia de hipermetilación de islas CpG en tumores con sistemas de reparación deficientes (MMR-) o correctos (MMR+).

La inestabilidad de microsatélites es consecuencia principalmente de una deficiencia en los sistemas de reparación, esencialmente en las enzimas hMLH1 o hMSH2. Una de las causas por las que la actividad enzimática de *hMLH1* se ve alterada, además de por mutaciones o polimorfismos, es consecuencia del silenciamiento por metilación aberrante de su promotor (Kinzler et al., 1996). En nuestra población existen diversos genes cuya metilación se asocia con la aparición de inestabilidad de microsatélites: *hMLH1* ($p<0.0001$), *RARB* ($p=0.0026$), *MINT1* ($p=0.0282$) y *MINT31* ($p=0.0046$), es decir, mayoritariamente genes del fenotipo metilador de islas CpG. Estos datos concuerdan en gran medida con los publicados por otros autores en

parte durante el desarrollo experimental de esta Tesis (Ward, 2003; Samowitz, 2005). Puesto que todos los tumores con inestabilidad de microsatélites presentaban deficiencias en el sistema MMR (Fisher test, $p < 0.0001$), las asociaciones entre MMR y metilación son las mismas que para MSI (Figura 74B). Es decir, que los tumores con sistema MMR deficiente presentaban mayor porcentaje islas CpG hipermetiladas del total de islas analizadas (Mann Whitney-Wilcoxon test, $p = 0.0003$).

4.2.7. Caracterización epigenética de líneas celulares y tumores primarios

4.2.7.1. Determinación del contenido en 5-mC en tumores humanos y sus correspondientes tejidos normales

Los bajos niveles de 5-metil citosina de ADN en tumores comparados con el nivel de metilación global de ADN en sus correspondientes tejidos normales fue una de las primeras alteraciones epigenéticas encontradas en cáncer en humanos (Feinberg et al., 1983). Con el fin de comprobar si esta afirmación se cumplía en nuestra población de estudio, se cuantificó, mediante HPCE, el contenido en 5-mC en el genoma de 31 tumores primarios humanos y sus correspondientes tejidos normales seleccionados.

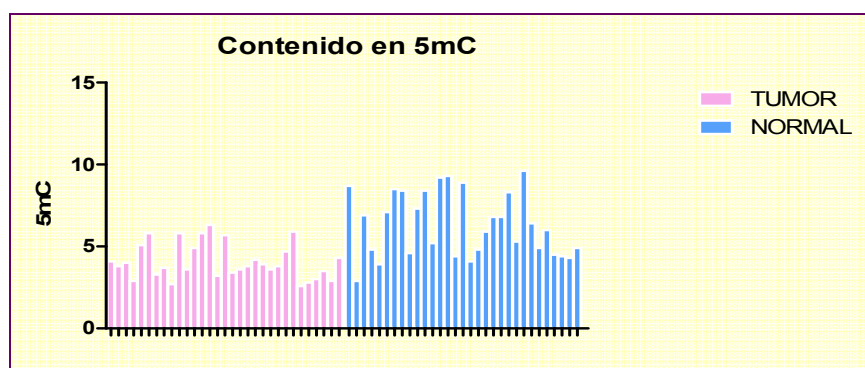


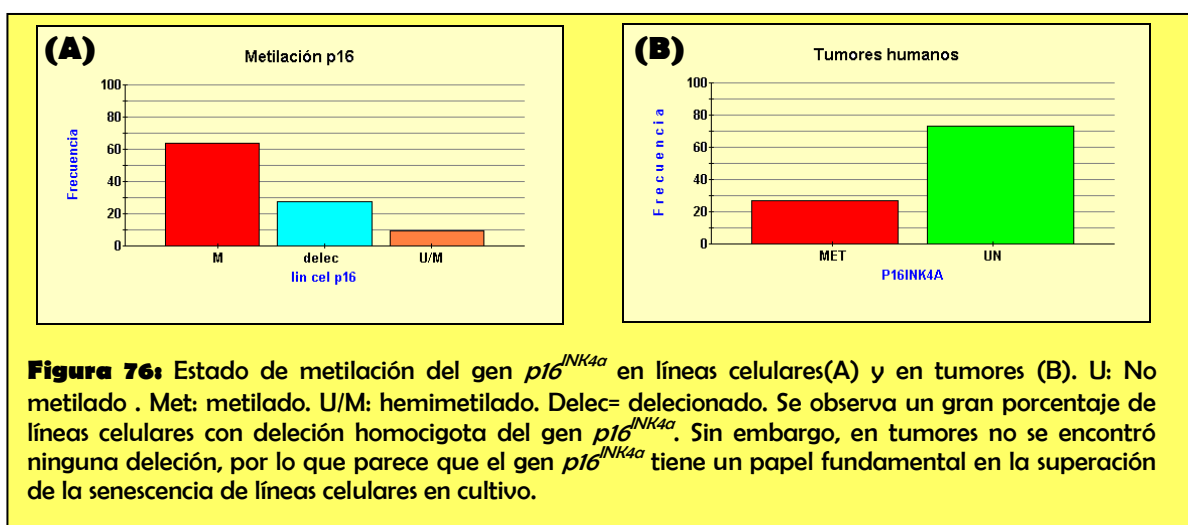
Figura 75: Contenido en 5-mC en tejido tumoral y normal. Se observa mayor cantidad de 5-mC en tejidos normales.

El contenido medio en 5-mC entre los tejidos normales fue del 6.31%, mientras que en los tumores fue del 4.09%, con una pérdida media del 35% de 5-mC en el genoma tumoral. Considerando cada paciente individualmente, el 93% de ellos (29 de 31) tenían el genoma tumoral hipometilado en comparación con el correspondiente tejido normal y el 7% (2 de 31) tuvieron niveles mayores de 5-mC en los tumores (Figura 75). No hubo ningún tumor con idéntica cantidad de 5-mC que su correspondiente tejido normal.

4.2.7.2. Determinación del estado de metilación en tumores humanos vs líneas celulares

Se realizó una comparación de los niveles globales de 5-mC en el genoma de 17 líneas celulares establecidas de tumores humanos (de las cuales, 10 eran de tumores colorrectales) y los tumores procedentes de los pacientes (n=31). Este análisis se realizó con el fin de determinar si el contenido global en 5-mC del ADN de líneas celulares establecidas refleja los valores encontrados en pacientes con carcinomas. El contenido medio en 5-mC en líneas celulares era 3.6%, mientras que el de los tumores primarios era de 4.09%. Al realizar el t-test no se encontraron diferencias significativas ($p=0.4462$). Estos datos resultan coherentes con la bibliografía (Paz et al., 2003).

Del mismo modo se compararon individualmente las tasas de cada isla CpG hipermetilada en las líneas de cáncer con la frecuencia de metilación aberrante en los tumores. La mayoría de las islas CpG analizadas mostraron una distribución similar entre las líneas y los tumores, lo que parece coherente con los resultados de otros investigadores (Costelo et al., 2000; Ueki et al., 2002; Paz et al., 2002). Sin embargo, se encontraron algunas diferencias estadísticamente significativas entre líneas y tumores primarios para algunas islas CpG; como por ejemplo el inhibidor del ciclo celular $p16^{INK4a}$, que se encontró hipermetilado en todas las líneas celulares analizadas excepto las que tenían delección homocigota, pero sólo en un 27% de los casos de cáncer colorrectal ($p<0.0001$) (Figura 76), lo que pone de manifiesto su papel esencial en la superación de la senescencia en líneas celulares en cultivo.



4.2.8. Asociación entre el contenido de 5-mC y porcentaje de hipermetilación de islas CpG en tumores y respuesta al tratamiento con 5-FU

No se encontró asociación entre el contenido en 5-metilcitosina ni el porcentaje de hipermetilación de islas CpG en el tejido tumoral y la respuesta a 5-FU. Por lo que, en principio, éste no parece ser un factor pronóstico de respuesta en cáncer colorrectal, aunque podría serlo en otros tipos tumorales, puesto que el perfil de metilación es característico de cada uno de ellos (Esteller et al., 2001; Costello et al., 2000).

4.2.9. Susceptibilidad genética a la metilación aberrante del ADN

Nos propusimos determinar si existía cierta susceptibilidad genética a presentar un patrón de metilación concreto por parte de los pacientes. Por otro lado, intentamos dilucidar si este patrón epigenético, de algún modo, podría estar vinculado con la respuesta al tratamiento de quimioterapia basado en 5FU.

Se procedió al análisis de las variantes genéticas naturales en proteínas indirectamente relacionadas con la metilación del ADN, como son aquellas que participan en el metabolismo de grupos metilo: MTHFR, CBS y MS.

4.2.9.1 Análisis de la relevancia de las variantes en tumores de los genes del metabolismo de grupos metilo y su asociación con parámetros de metilación del ADN analizados

Se cotejaron los genotipos de las cuatro variantes germinales de las enzimas MTHFR, MS y CBS con el contenido total de 5-mC en el ADN procedente de tejido normal y tumoral. Los resultados obtenidos se compararon con el porcentaje de islas CpG hipermetiladas de todos los tumores colorrectales (Tablas 22 y 23). El análisis estadístico para evaluar el contenido en 5-metilcitosina con respecto a los polimorfismos presentes en los genes del metabolismo de grupos metilo se llevó a cabo con el test de Kruskal-Wallis. La comparación de estos polimorfismos con la frecuencia de hipermetilación de islas CpG en tumores colorrectales se realizó con el test de Chi-cuadrado.

Polimorfismo	n	Tumor			p	Normal			p
MTHFR C677T		Media	Mediana	P25-P75		Media	Mediana	P25-P75	
CC	15	4.5	4.1	3.7-5.8	0.0088	7.8	8.3	6.8-8.7	0.0002
CT	9	4.1	3.8	3.5-4.9		4.0	4.8	4.4-5.2	
TT	7	3.2	2.9	2.8-3.4		5.7	4.6	4.3-4.9	
MTHFR A1298C									
AA	17	4.2	4.0	3.2-5.7	0.9796	6.8	6.9	4.8-8.7	0.0458
AC	10	3.9	3.8	3.5-4.3		5.1	4.7	4.3-5.9	
CC	4	4.2	3.7	3.5-4.9		7.2	7.4	5.9-8.5	
M5 A2756G									
AA	24	3.9	3.7	3.3-4.5	0.1558	6.0	5.6	4.5-7.8	0.1133
AG	7	4.6	4.0	3.7-5.8		7.2	7.1	5.3-9.2	
CB3-in:68pb									
NN	23	4.1	3.8	3.3-4.9	0.7862	6.4	5.9	4.6-8.5	0.7178
NI	8	4.2	3.9	3.4-5.1		6.0	6.4	4.7-7.2	

Tabla 22: Contenido de 5-mC en el ADN en función del genotipo de los genes implicados en el metabolismo del grupo metilo. La p se calculó con el Test de Kruskal-Wallis (se considera significativa $p < 0.05$)

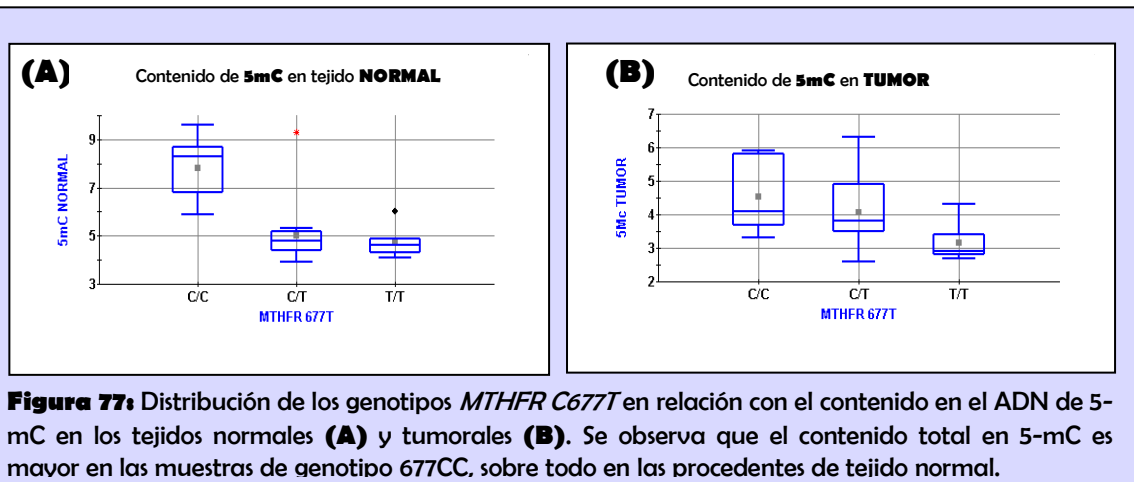
Los polimorfismos, analizados por separado, no mostraron una asociación estadísticamente significativa con el estado de metilación del ADN, excepto en los siguientes casos:

- Los pacientes con genotipos homocigoto TT y heterocigoto CT tenían menor cantidad de 5-mC tanto en el ADN procedente de tejido normal como tumoral (Test Kruskal-Wallis, $p=0.0002$ y $p=0.0088$ respectivamente). En tejido tumoral, los niveles de 5-mC fueron de 4.1% en heterocigotos y 3.2% los homocigotos TT, frente al 4.5% que presentaban los homocigotos CC (Figura 77B). Estas diferencias eran aún más significativas en el tejido normal, donde la cantidad de 5-mC de CT y TT era de 4 y 5.7% respectivamente, frente al 7.8% de los homocigotos silvestres CC (Figura 77A). Considerando los alelos individuales, la presencia del alelo *MTHFR* 677T también se asoció con un contenido en 5-mC más bajo que el percentil 25 de la distribución general (Test de Kruskal-Wallis $p=0.0126$). Es decir, que el alelo 677T se asocia con una hipometilación global.

Estos datos fueron coherentes con los que se habían publicado anteriormente en la bibliografía (Paz et al., 2002).

Polimorf	N	0-10% n(%)	17-30% n(%)	33-40% n(%)	≥50% n(%)	p (χ ²)	CIMP+ n(%)	p (χ ²)	OR	95% IC
MTHFR C677T										
CC	48	28 (58,3%)	5 (10,4%)	5 (10,4%)	10 (20,8%)	0,4840	16 (33,3%)	0,4700	1,00	0.62-1.6
CT	38	18 (47,4%)	10 (26,3%)	5 (13,2%)	6 (13,2%)		9 (23,7%)		0,71	
TT	15	10 (66,7%)	2 (13,3%)	1 (6,7%)	2 (13,3%)		3 (20%)		0,60	
MTHFR A1298C										
AA	49	28 (57,1%)	8 (16,3%)	4 (8,2%)	9 (18,4%)	0,6678	14 (28,6%)	0,9221	1,00	0.23-1.02
AC	39	20 (51,3%)	8 (20,5%)	4 (10,3%)	7 (18%)		10 (25,6%)		0,90	
CC	13	8 (61,5%)	1 (7,7%)	3 (23,1%)	1 (7,7%)		4 (30,8)		1,08	
M3- A2756G										
AA	79	44 (55,7%)	12 (15,2%)	9 (11,4%)	14 (17,7%)	0,8401	24 (30,4%)	0,2583	1,00	0.53-1.89
AG	22	12 (54,6%)	15 (22,7%)	2 (9,1%)	3 (13,6%)		4 (18,2%)		0,60	
CB3- in168pb										
NN	23	14 (60,9%)	2 (8,7%)	2 (8,7%)	5 (21,7%)	0,4428	8 (34,8%)	0,5095	1,00	0.7-1.42
NI	76	42 (55,3%)	14 (18,4%)	9 (11,8%)	11 (14,5%)		19 (25%)		0,72	

Tabla 23: Frecuencia de hipermetilación de islas CpG en función del genotipo de los genes implicados en el metabolismo de grupos metilo. El análisis se realizó con el test de χ^2 y para los odds ratio se tomó como referencia el genotipo silvestre.



- Los tejidos normales con genotipo heterocigoto 1298AC tenían menor cantidad de 5-mC (Kruskal-Wallis $p=0.0458$) que los de genotipo homocigoto 1298AA pero también que los homocigotos 1298CC (Figura 78A). Esta asociación no se encontró en tejidos tumorales (Kruskal-Wallis, $p=0.9796$) (Figura 78B). Puesto que la población es bastante limitada, debería repetirse la comparación con un número

mayor de muestras, quizás entonces esta asociación podría determinarse con mayor precisión.

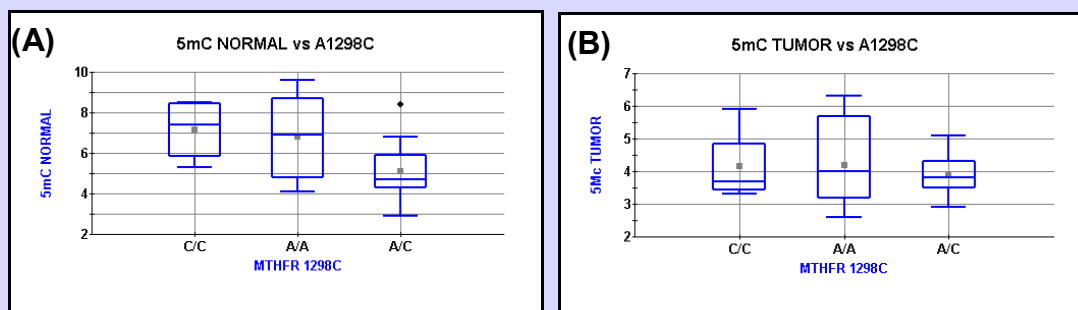


Figura 78: Distribución de los genotipos *MTHFR A1298C* en relación con el contenido en el ADN de 5-mC en los tejidos normales **(A)** y tumorales **(B)**.

- No se encontraron asociaciones significativas entre las variantes de los tres genes del metabolismo del metilo y el porcentaje de islas CpG hipermetiladas. Quizás sería conveniente ampliar el número de genes estudiados para determinar si existe algún tipo de asociación entre hipermetilación y polimorfismos.

4.2.9.1.1 Genotipado de los polimorfismos de genes implicados en metabolismo de grupos metilo y relación con el estado de metilación del tumor en pacientes de cáncer colorrectal

Se abordó la posible interacción entre las diferentes variantes germinales de los tres genes del metabolismo del metilo. De este modo, se compararon todos los posibles haplotipos generados de la combinación de cada genotipo separado de los cuatro polimorfismos (Mander et al., 2001). Sólo encontramos cierta tendencia de asociación entre los alelos individuales y las alteraciones en la metilación del ADN (*MTHFR-677T* e hipometilación genómica global, y *MS2756G* y menor tasa de hipermetilación de islas CpG) (Figura 79). Estos resultados habían sido descritos previamente por otros investigadores (Paz et al., 2002).

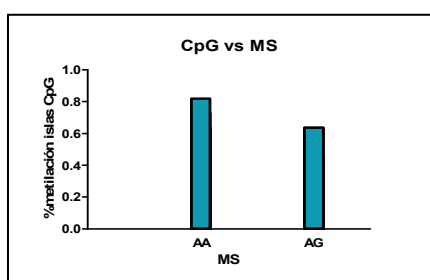


Figura 79: Distribución de los genotipos de *MS A2756G* en relación con la frecuencia de hipermetilación de islas CpG en los tumores: el genotipo AG se asocia con un menor número de islas CpG hipermetiladas de genes supresores de tumores. No se muestra el genotipo GG porque no hubo ningún caso con este genotipo.

4.2.9.1.1.1. Polimerfismos *MTHFR*, *CBS* y *MS* vs hipermetilación islas CpG de genes de ciclo celular y reparación del ADN

No se encontró ninguna asociación significativa entre la presencia de variantes alélicas en los genes del metabolismo de grupos metilo (*MTHFR*, *CBS* y *MS*) y el estado de metilación de *p14^{ARF}* ni *p16^{INK4a}*. Sin embargo, la variante 2756G en el gen *MS*, se asociaba con un estado no metilado del gen *APC* (Fisher test, $p=0.0408$). Aun así, la metilación de un solo gen no es un dato relevante a grandes rasgos.

4.2.10. Caracterización epigenética de los diferentes tumores colorrectales y sus consecuencias en relación con la respuesta a quimioterapia basada en 5-FU

Aparte de los factores genéticos, para predecir la respuesta a quimioterapia basada en 5-FU debe tenerse en cuenta el perfil epigenético del tumor. Dado que cada tipo tumoral cuenta con un perfil de metilación característico, es trascendental establecer un perfil de metilación en tumores colorrectales que se asocie a cada tipo de respuesta a quimioterapia basada en 5-FU. Mediante la técnica de PCR específica de metilación, se caracterizó un panel de genes en las muestras tumorales de los pacientes con CRC.

	<i>p16^{INK4a}</i>	<i>p14^{ARF}</i>	<i>MGMT</i>	<i>APC</i>	<i>hMLH1</i>	<i>LKB1</i>	<i>CRBP1</i>	<i>RARb</i>	<i>MINT1</i>	<i>MINT2</i>
<i>p16^{INK4a}</i>										
<i>p14^{ARF}</i>										
<i>MGMT</i>	87% $p=0.0045$									
<i>APC</i>										
<i>hMLH1</i>				86% $p=0.0391$						
<i>LKB1</i>										
<i>CRBP1</i>			76% $p=0.0001$		56% $p=0.0036$	55% $p=0.0531$				
<i>RARb</i>	91% $p=0.000$		77% $p=0.0076$		52% $p=0.0086$	52% $p=0.030$	83% $p<0.0001$			
<i>MINT1</i>	81% $p<0.0001$	95% $p<0.0001$	96% $p<0.0001$				83% $p=0.0006$	95% $p=0.0001$		
<i>MINT2</i>	85% $p=0.0003$	78% $p=0.0355$	82% $p=0.0003$			67% $p=0.0417$	83% $p=0.0004$	83% $p=0.0006$	80% $p<0.0001$	
<i>MINT31</i>	93% $p=0.0150$	87% $p<0.0001$	85% $p=0.0001$	59% $p=0.0472$		57% $p=0.0201$	83% $p=0.0253$	95% $p=0.0406$	80% $p=0.0028$	88% $p=0.0001$
<i>CIMP</i>	89% NEG $p<0.0001$	88% NEG $p<0.0001$	88% NEG $p=0.0037$		96% NEG $p=0.0043$	100% $p=0.0012$	89% NEG $p<0.0001$	87% NEG $p<0.0001$	84% NEG $p=0.0001$	92% NEG $p<0.0001$

Tabla 24: Relación entre el estado de metilación de las islas CpG de los distintos genes analizados. (Fisher test, p significativa por debajo de 0.05) En amarillo aparecen los genes considerados para el fenotipo metilador (CIMP). Las casillas en verde indican estado no metilado de los promotores que convergen en ellas. Se observa que el estado natural de estos genes es no metilado, sobre todo los genes que determinan el fenotipo CIMP. La clasificación molecular de cáncer colorrectal basada en CIMP es cada vez más importante porque el estado de CIMP refleja las aberraciones epigenómicas en células tumorales.

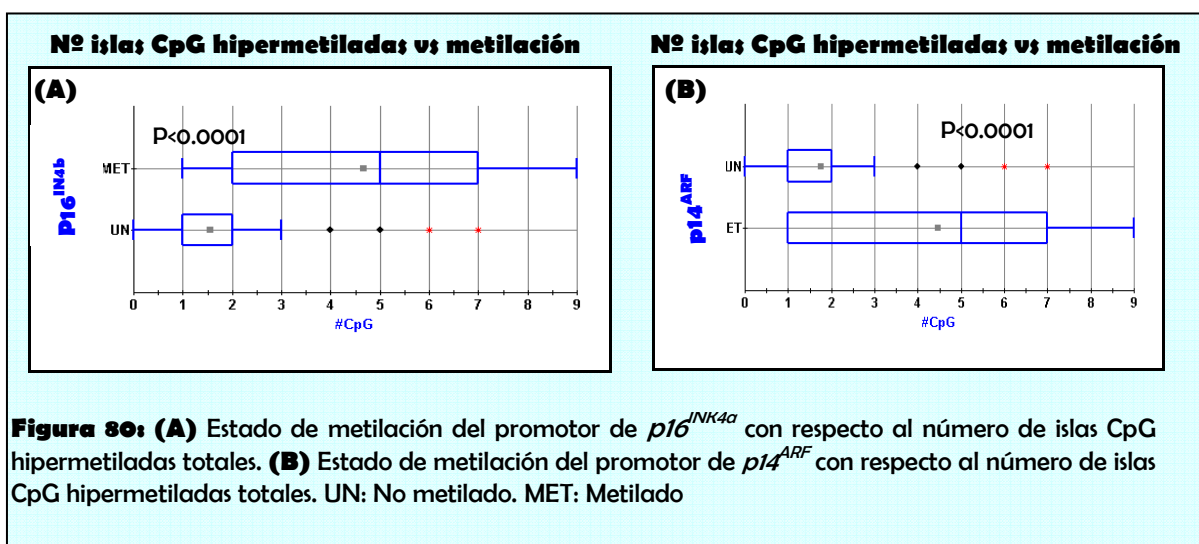
Primeramente, analizamos el estado de metilación de las islas CpG de promotores de genes que actúan en el ciclo celular y vimos que la gran mayoría (más del 80%) de los tumores que no presentaban metilación en $p16^{INK4a}$, tampoco tenían metilado *MGMT* (test Fisher, $p=0.0045$), *RARB* (test Fisher, $p=0.0004$), *MINT1* ($p<0.0001$), *MINT2* ($p=0.0003$), ni *MINT31* ($p=0.0150$) (Tabla 24). A la luz de estos datos, se realizó un ANOVA factorial para ver la relación de estos cuatro genes, y se obtuvo una significancia estadística ($p<0.0001$) para el estado no metilado de todos ellos: 58 de 101 pacientes presentaban los cuatro genes no metilados.

4.2.10.1. Análisis exhaustivo del estado de metilación de islas CpG en promotores de genes característicos del fenotipo metilador (CIMP)

4.2.10.1.1. Estado de metilación de $p14^{ARF}$, $p16^{INK4a}$ y genes de la familia MINT

Teniendo en cuenta el análisis de las islas CpG propuestas para fenotipo metilador, se comprobó que el 89% de los tumores CIMP negativos tenían $p16^{INK4a}$ no metilado (Fisher test, $p<0.0001$).

Los tumores con fenotipo CIMP se localizan con mayor frecuencia en el lado proximal. Algunos autores han señalado que los tumores proximales presentan con mayor frecuencia metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ (Burri et al., 2001). Teniendo en cuenta estos antecedentes, comprobamos dicha asociación y no encontramos significancia en nuestra población de estudio. En cambio sí encontramos una asociación significativa entre la localización distal del tumor y el fenotipo CIMP negativo (Fisher test, $p=0.0315$), conforme con aquellos resultados. Para consolidar aún más esta concordancia, se observó que en los pacientes que presentaban más de dos islas CpG (18% de CpG analizadas) hipermetiladas, una de ellas solía ser la del promotor de $p16^{INK4a}$ (Mann-Wilcoxon test, $p<0.0001$) (Figura 80).



Existen teorías que afirman que la hipermetilación empieza en un punto y se extiende a los promotores cercanos. Como los promotores de $p14^{ARF}$ y $p16^{INK4a}$ están en el mismo locus, planteamos la hipótesis de que la hipermetilación del promotor de $p16^{INK4a}$ podría estar relacionada con la del gen adyacente $p14^{ARF}$. Ensayamos todas las muestras por MSP (como se indica en material y métodos) para ver el estado de metilación de este último. Se vio que $p14^{ARF}$ aparecía hipermetilado en presencia de $p16^{INK4a}$ no metilado en 14 de 101 pacientes (13.86%), mientras que el estado hipermetilado de ambos promotores ocurría en 10 de los 101 casos analizados (9.9%) (Figura 80). Por otro lado, el gen $p14^{ARF}$ se encontraba silenciado por hipermetilación de su promotor en aproximadamente un cuarto de las neoplasias estudiadas, dato que concuerda con los datos de Esteller y colaboradores (Esteller et al., 2000). Por tanto, la hipótesis de partida no se confirmó; es decir, la metilación de un promotor no tiene por qué afectar a otros adyacentes.

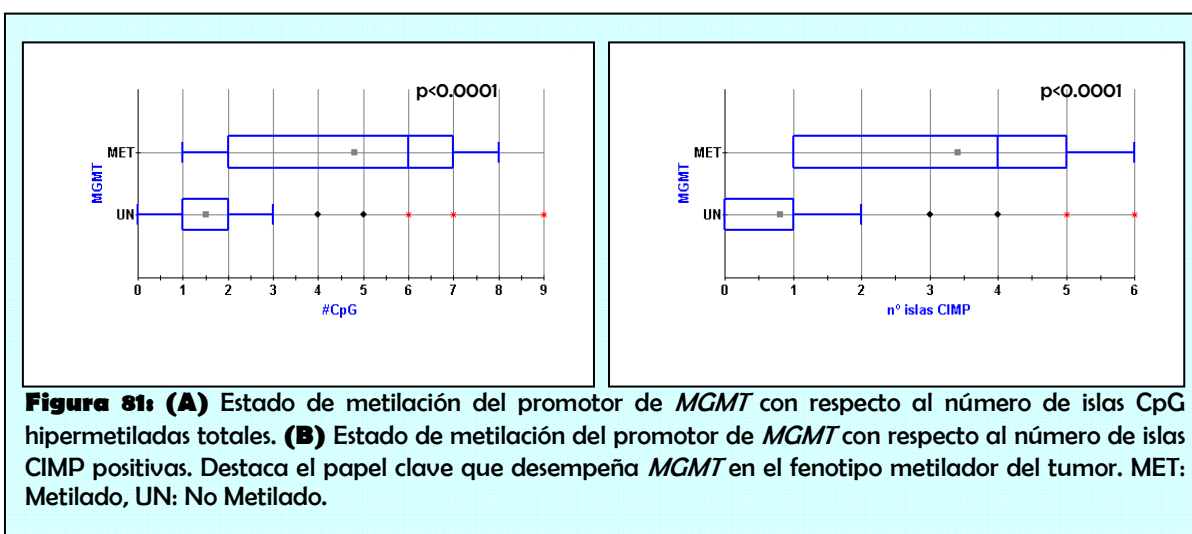
Puesto que la mayoría de los tumores no presentaban $p14^{ARF}$ metilado, al realizar el test de Fisher se vio que el 88% de aquellos tumores con fenotipo CIMP negativo no tenían metilado el promotor de $p14^{ARF}$ ($p < 0.0001$). Análogamente, los tumores que tenían más de un marcador CIMP metilado, siempre tenían hipermetilado $p14^{ARF}$ (χ^2 , $p < 0.0001$). Además, todos los pacientes que tenían más de dos islas CpG hipermetiladas (no necesariamente islas asociadas al fenotipo CIMP), también tenían $p14^{ARF}$ metilado (Mann-Wilcoxon test, $p < 0.0001$) (Figura 81). Estos resultados apuntan a que la hipermetilación del promotor del gen $p14^{ARF}$ es un proceso relativamente común en la tumorigénesis y no está necesariamente asociado con el estado de metilación de su gen vecino, $p16^{INK4a}$ ni con el estado de $p53$.

Se vio que $p14^{ARF}$ se presentaba no metilado junto a $MINT1$ (95%; $p < 0.0001$), $MINT2$ (78%; $p = 0.0355$) o $MINT31$ (87%; $p < 0.0001$). Al realizar un ANOVA multifactorial para establecer si existía interacción entre el estado de metilación de los promotores de los genes $MINT$ y $p14^{ARF}$, resultó que el 62% (63 de 101) de los pacientes con $p14^{ARF}$ no metilado presentaban los tres genes $MINT$ en estado no metilado. La metilación aberrante del promotor de $p14^{ARF}$ en carcinomas colorrectales no se asociaba significativamente con diferencias de edad, sexo, dieta, estadio de Duke o cualquier otra característica de las incluidas en esta población. Algunos autores señalan que existe una asociación entre los tumores con $p53$ funcional y la inactivación epigenética de $p14^{ARF}$ (Esteller et al., 2000-b), aunque no se ha logrado establecer una significancia estadística. Cuando se clasificaron las muestras según el estado de $p53$, se vio que, aunque tampoco era estadísticamente significativa, existía una tendencia a que los tumores con $p53$ mutado no tuvieran hipermetilado el promotor de $p14^{ARF}$ (43 tumores de un total de 53 con genotipo $p53$ mutante) (χ^2 , $p = 0.2246$).

4.2.10.1.2. Estado de metilación de *MGMT*

Para una completa caracterización epigenética del genoma de los tumores de colon, es fundamental el análisis del gen *MGMT*, que codifica para una proteína reparadora que elimina los depósitos mutagénicos y citotóxicos de O6-guanina en el ADN (Pegg et al., 1990) y cuyo promotor aparece metilado de forma aberrante en el 40% de los tumores colorrectales (Esteller et al., 1999). Puesto que el 5-FU se administra junto con oxaliplatino, agente que genera estos depósitos en el ADN, quisimos comprobar si el estado de metilación del gen *MGMT* en los pacientes de cáncer colorrectal, aparecía asociado a algún patrón de metilación característico de un tipo de respuesta. En nuestra población de estudio la presencia de *MGMT* hipermetilado era mucho menor de la esperada (27% vs 40%), posiblemente por la media de edad. Dado que es frecuente encontrar el promotor de *MGMT* hipermetilado junto a *k-ras* mutado (Esteller et al., 2000-c), sería interesante realizar un análisis mutacional de este gen para ver con qué frecuencia aparece en la población de estudio y si se asociaría con un determinado rango de edad.

Los resultados de MSP también indicaron que el 80% de los tumores distales no presentaban metilación en el gen *MGMT* ($p=0.0216$) y además tenían fenotipo metilador negativo ($P=0.0337$). De hecho, el 88% de los tumores con fenotipo metilador negativo no tenían metilado *MGMT* (Fisher test, $p<0.0001$) y únicamente los tumores con más del 14% de islas asociadas al fenotipo metilador CIMP positivo hipermetiladas, presentaban metilación de dicho gen (χ^2 , $p<0.0001$). En cuanto a la hipermetilación general de islas CpG de todos los promotores estudiados, no sólo los vinculados al fenotipo metilador, los pacientes con más de dos islas CpG metiladas (18% del total de islas analizadas) presentaban metilación aberrante en el promotor del *MGMT* (Mann-Wilcoxon test, $p<0.0001$) (Figura 81). Todos estos datos soportan el argumento de que el gen *MGMT* es un factor determinante del fenotipo metilador.



Los análisis de metilación también indicaron que aquellos tumores que no tenían metilado el promotor de *MGMT*, tampoco tenían metilado el promotor de *CRBP1* (76%, Fisher test, $p=0.0001$), *RARB* (77%, Fisher test, $p=0.0076$), *MINT1* (96%, Fisher test, $p<0.0001$) ni *MINT2* (82%, Fisher test, $p=0.0003$). A la vista de estos datos, se confirma el papel crítico de la metilación anómala del promotor de *MGMT* como uno de los determinantes del fenotipo metilador, puesto que los tumores que no tienen la isla CpG del promotor de este gen hipermetilada presentan, en general, menor porcentaje de hipermetilación de islas CpG en promotores.

Los pacientes con *APC* no metilado tampoco presentaban metilación en *hMLH1* (85.7%, test χ^2 , $p=0.0391$; Fisher test, $p=0.0616$), *MINT31* (59% test χ^2 , $p=0.0472$; Fisher test, $p=0.0604$), *LKB1* (test χ^2 , $p=0.0208$), *CRBP1* (Fisher test, $p=0.0036$), *RARB* (Fisher test, $p=0.0086$) ni *MINT2* (Fisher test, $p=0.0256$). A la vista de estos resultados, *APC* no es un factor crítico para el fenotipo metilador.

4.2.10.1.3. Estado de metilación de *hMLH1* e Inestabilidad de Microsatélites (MSI)

El fenotipo metilador de islas CpG es un subgrupo de carcinomas colorrectales caracterizados por hipermetilación concordante de múltiples islas CpG de promotores situados en distintos loci. Estos tumores tienen características clinicopatológicas peculiares, tales como la asociación con inestabilidad de microsatélites (MSI), localización en colon proximal, preponderancia femenina, alta frecuencia de mutación del proto-oncogén *BRAF* y baja frecuencia de mutación del proto-oncogén *k-ras* (Toyota et al., 1999; Ogino et al., 2006). Además, los cánceres colorrectales CIMP-positivos (CIMP+) se asocian con peor respuesta clínica (Ward et al., 2003; Samowitz et al., 2005). Se encontró una asociación significativa entre los tumores sin fenotipo metilador CIMP- (96% del total de tumores analizados, $\leq 14.3\%$ islas CIMP) que no presentaban metilación aberrante del promotor del gen *hMLH1* (Fisher test, $p=0.0043$, Mann-Whitney Wilcoxon, $p=0.0012$) (Figura 82A).

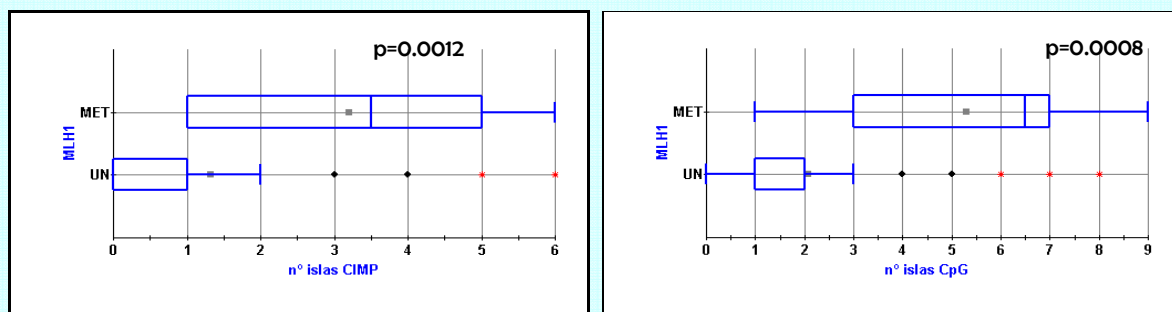
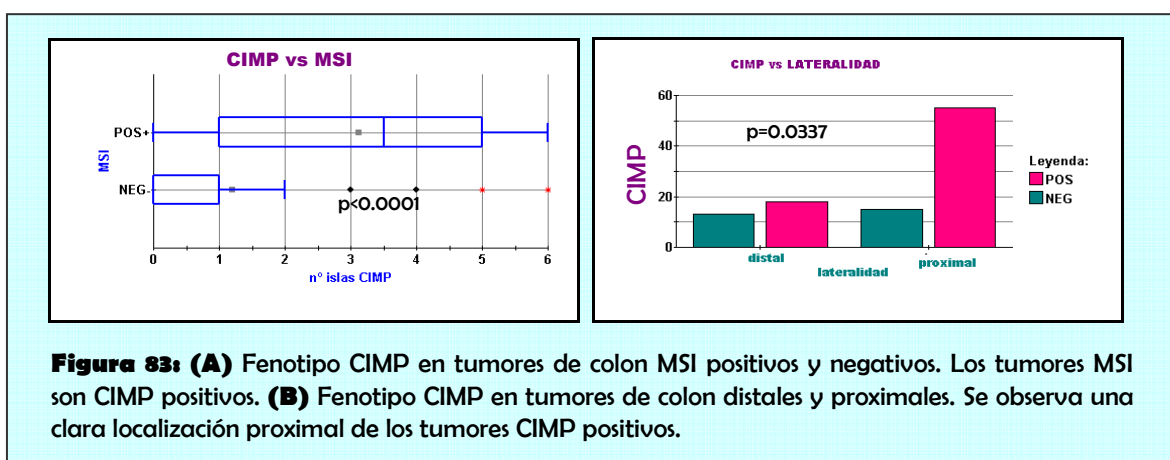


Figura 82: (A) Estado de metilación del promotor de *hMLH1* con respecto al número de islas CIMP positivas. Destaca el papel clave que desempeña *MGMT* en el fenotipo metilador del tumor. (B) Estado de metilación del promotor de *hMLH1* con respecto al número de islas CpG hipermetiladas totales.

Las alteraciones en el sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR) en cáncer colorrectal esporádico suelen asociarse en algunos casos al silenciamiento transcripcional del gen *hMLH1* por hipermetilación de su promotor, lo que conlleva un fuerte fenotipo mutador e inestabilidad de microsatélites (MSI) (Herman et al., 1998). *hMLH1* es el gen clave del sistema de reparación MMR. En nuestra población de estudio, los pacientes con más de 3 islas CpG hipermetiladas (> 27%) del total de islas analizadas, presentaban hipermetilación en el promotor de *hMLH1* (Wilcoxon test, $p=0.0008$) (Figura 82B). Además todos los pacientes cuyos tumores no presentaban inestabilidad de microsatélites, tenían *hMLH1* no metilado (Fisher test, $p<0.0001$) y sus sistemas de reparación MMR funcionaban correctamente.

Con el objeto de hallar una asociación entre el fenotipo metilador y la inestabilidad de microsatélites a mayor escala (es decir, no sólo a través de promotores individuales), estudiamos la correlación entre el estado de metilación de todos los genes analizados y estos dos parámetros. Confirmamos que el 93% de los tumores MSI negativos (*MMR proficiency*) tenían menos de dos islas CIMP metiladas (Wilcoxon test, $p=0.0004$). Se encontró una fuerte asociación entre la metilación aberrante del promotor de *hMLH1* y los marcadores CIMP, seguida de *MINT1*, *MINT2*, *MINT31*, *p14^{ARF}* y *p16^{INK4a}*. Por otro lado, se correlacionó el estado hipermetilado de los marcadores CIMP con MSI. La unión de ambos resultados confirma que el fenotipo metilador, especialmente la hipermetilación anómala de *hMLH1* resulta clave en la carcinogénesis de tumores de colon MSI, como ya sugirieron *Goel y colaboradores* (Goel et al., 2007).

Se realizó una segregación de tumores según los patrones de alteración genómica o epigenética. Encontramos que aquellos tumores MSI-positivos presentaban frecuentemente hipermetilados la mayoría de los marcadores CIMP (Figura 83A). Esos marcadores a su vez, presentaban mayor frecuencia de metilación en esos tumores ($p=0.01$ - $p<0.0001$) comparados con los tumores MSI-negativos.



Al igual que ocurría con la inestabilidad de microsatélites en tumores de colon, tampoco se hallaron diferencias significativas en el fenotipo metilador (CIMP) atendiendo a grupos de edad o sexo, a diferencia de los datos publicados por Ogino y colaboradores, probablemente debido a que no utilizaron los genes de la familia *MINT* como marcadores asociados al fenotipo CIMP.

4.2.10.2. Fenotipo metilador y localización del tumor en cáncer colorrectal

Anteriormente se han mencionado las características propias de tumores colorrectales con fenotipo metilador, entre las que destacaba cierta tendencia a localizarse en el lado derecho o proximal del colon (Ward, 2003; Samowitz, 2005). Cuando realizamos esta comparación en la población de estudio, resultó que los tumores CIMP positivos se localizaban significativamente en colon proximal (p-value 0.0337 test chi-cuadrado) (Figura 83B), lo que corrobora los estudios publicados anteriormente. Aun así, no se pudieron establecer asociaciones entre tumores con fenotipo metilador y MSI. Tampoco se pudo asociar el fenotipo CIMP positivo con un tipo de respuesta a la terapia. En resumen, la regulación epigenética, aunque imprescindible, no es suficiente para determinar el patrón de respuesta o la toxicidad a 5-FU en cada tumor.

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN I: LÍNEAS CELULARES

5.1.1. Determinación de la sensibilidad a 5-FU en líneas celulares de cáncer de colon mediante ensayos de MTT y clonogénicos

Con el fin de comprobar la sensibilidad y resistencia a 5-FU de todas las líneas celulares de cáncer de colon ensayadas, se llevaron a cabo los ensayos de potencial clonogénico de cada una de ellas tratadas con diferentes dosis de 5-FU. Se observó una respuesta coherente entre los resultados de citotoxicidad y la capacidad para formar colonias en estas líneas, de manera que aquellas que tenían índices IC50 e IG50 bajos, mostraban poca capacidad de formar colonias, exceptuando el caso de SW480, cuyo índice IG50 era bastante elevado a pesar de tener potencial clonogénico e IC50 mínimos. Este hecho no implica que la célula sea resistente a 5-FU, puesto que no mostró mecanismos propios de resistencia como podría ser la evasión de la apoptosis. Lo que indican estos datos es que la cantidad de droga necesaria para inhibir el crecimiento es elevada, pero una vez alcanzada la dosis adecuada, la célula es sensible; de hecho, la droga resultó ser bastante citotóxica a dosis de 50uM.

La línea con mayor capacidad clonogénica fue SW620, cuyos índices también indicaron que era una línea con escasa sensibilidad a 5-FU, incluso cuando la dosis administrada era de 500uM. Por ello, fijamos esta línea celular como uno de los dos ejemplos de baja sensibilidad a 5-FU para todos los experimentos realizados en esta tesis.

SW48, a pesar de ser una línea resistente a 5-FU por su alto IC50 y gran potencial clonogénico, tenía un índice IG50 bastante bajo. Por tanto, la dosis necesaria para inhibir el crecimiento no necesita ser tan concentrada como la que inhibe a SW620. No obstante, esta línea tiene baja sensibilidad a 5-FU porque presenta mecanismos de resistencia como desregulación de la expresión de algunos genes del ciclo celular.

5.1.1.1. Efecto de los niveles de ácido fólico en el medio sobre la sensibilidad a 5-FU en líneas celulares de colon

Se cultivaron líneas celulares de colon en medios pobres en ácido fólico para hacerlos semejantes a las condiciones fisiológicas de los tumores de colon humanos. De este modo, el medio de cultivo representaría los niveles de folato que se encuentran en el plasma sanguíneo. Nos propusimos determinar si la resistencia a 5-FU en líneas celulares estaba mediada por este nutriente, y si sería extrapolable a tumores *in vivo*.

Los resultados obtenidos demostraron que los niveles de folato presentes en el medio eran determinantes de la sensibilidad a 5-Fluorouracilo en líneas celulares de colon, de forma que las células eran significativamente más sensibles al tratamiento cuando se les privaba de la fuente de folato en el medio de cultivo. Este resultado establece un claro vínculo entre la vía metabólica del 5-Fluorouracilo y la ruta del folato. Esta encrucijada metabólica tiene un nexo en la enzima TS, principal diana de acción de 5-FU y MTHFR. TS es la enzima

responsable de la síntesis de folato circulante en su forma reducida. Las células no tienen un sistema que transporte el folato desde el medio de cultivo a la célula como ocurre con el sistema digestivo, que transporta directamente el folato de la dieta a las células del colon. En el medio de cultivo el aporte de folato es en forma de ácido fólico (folato oxidado), por lo que no puede asemejarse con el folato intracelular reducido procedente de la dieta, sino con el folato presente en el plasma. No es comparable medir niveles bajos de folato en el medio de cultivo con una dieta pobre en folatos, en cambio, sí es comparable con la existencia de niveles disminuidos en plasma. Por ello, sería interesante medir las concentraciones de folato tumorales y plasmáticas antes y después del tratamiento con 5-FU para establecer una asociación con la respuesta al mismo. Nuestra hipótesis radica en que los niveles bajos de folato oxidado en plasma, procedentes de la excreción celular, se asociarían con una mejor respuesta a 5-FU. Sin embargo, los niveles bajos de folato reducido en el tumor, a través de su correlación con niveles elevados de TS, se asociarían con una mayor resistencia al tratamiento, y esto sí sería comparable a una dieta pobre en folatos.

La depleción de folato reducido intracelular produciría una regulación positiva de la función enzimática de MTHFR. Por tanto, se favorecería la reducción de 5,10-MTHF a 5-MTHF, que es la forma en la que se encuentra el folato circulante en la célula. Esta actividad de MTHFR, que resulta necesaria para mantener el reservorio de folato de la célula, tiene una consecuencia directa que consiste en la reducción de los niveles de sustrato, 5,10-MTHF. Éste es un agente imprescindible para la inhibición de TS por 5-FU en la formación del complejo ternario. En ausencia de este cofactor 5-FU no podría inhibir a TS a través de dicho complejo. Por tanto, la célula perdería sensibilidad a 5-FU. Por ello, los niveles bajos de folato reducido intracelular, así como la ingesta pobre en folato, se asocian con una mayor resistencia a la droga.

Además, en el medio de cultivo, aunque se retire el ácido fólico, sigue existiendo un aporte de metionina y otros nutrientes que hacen que no sea del todo comparable con el medio fisiológico.

5.1.2. Genotipado de líneas celulares establecidas de cáncer humano

En los genes de la ruta metabólica del 5-FU, se encontró que las frecuencias genotípicas para el polimorfismo *TSE*R variaban en gran medida con respecto a las encontradas en pacientes. No obstante, la cohorte de líneas celulares era bastante limitada, por lo que resulta imprescindible su ampliación para llegar a una significancia estadística en la distribución de frecuencias de cada polimorfismo.

La frecuencia de distribución del polimorfismo presente en el extremo 3'UTR de *TYMS* era inesperada, dado que no se encontraron líneas celulares con genotipo homocigoto silvestre. El alelo deletado (-6pb) provoca inestabilidad en el ARNm de *TYMS*, por lo que la célula tendría niveles disminuidos de esta enzima. Este alelo variante parece haberse

seleccionado evolutivamente, lo que podría indicar que confiere cierta ventaja selectiva a la célula.

En cuanto al gen *MTHFR*, el polimorfismo C677T daba lugar a un genotipo heterocigoto que aparecía con la misma frecuencia que el homocigoto silvestre. Del mismo modo que en *TYMS*, la distribución de dicho polimorfismo variaba significativamente con respecto a las muestras tumorales de pacientes. Era más frecuente el alelo mutante en células que en pacientes. Este alelo variante podría conferir ventaja a la célula tumoral sobre el alelo normal, puesto que produce una disminución en la actividad enzimática. Esta disfuncionalidad provoca una desregulación en el mecanismo de metilación, al disminuir la síntesis de SAM, donador universal de grupos metilo. Esto, en cierto modo, podría contribuir a la desregulación epigenética que manifiestan las células malignas. Cuando las líneas analizadas eran únicamente de tipo colorrectal, la diferencia de distribución de alelos *MTHFR-C677T* entre líneas celulares y pacientes continuaba presente. Existen requerimientos metabólicos que son imprescindibles en el medio fisiológico, pero que no revisten tanta importancia en el medio de cultivo. Las células en cultivo pueden prescindir de la tasa de transcripción de algunos genes como los de síntesis de ácido fólico, puesto que el medio es rico en nutrientes. Por otro lado, pueden tener mutaciones que les confieran ventaja selectiva para adaptarse al medio en cultivo. Este dato apoya la hipótesis de que los tumores se van haciendo cada vez más agresivos por acumulación de mutaciones. Así, en una línea celular establecida, la presencia de mutaciones puede ser mucho mayor que en un tejido normal del paciente e incluso mayor que en el propio tumor a partir del cual se estableció. De hecho, como se comentará más adelante, algunos pacientes en los que el tejido tumoral tenía mutaciones, presentaban línea germinal con genotipo normal.

Dicha variación se debe a los cambios que sufre la célula para adaptarse al medio *in vitro*. Este dato refleja que las líneas celulares establecidas son muy útiles como modelos de ensayos *in vitro* para fármacos y otros fines. No obstante, ha de tenerse en cuenta que las diferencias a nivel genético son importantes.

5.1.3. Sensibilidad y respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo/oxaliplatino en líneas celulares establecidas de cáncer humano

No existe un único determinante biológico de resistencia o sensibilidad a 5-FU, sino que es un proceso complejo que puede depender, en parte, del patrón y magnitud de las alteraciones en el *pool* de nucleótidos.

El 5-fluorouracilo es rápidamente metabolizado por enzimas en diversas rutas que llevan a la síntesis de sus dos metabolitos activos. El 5-FUTP puede ser incorporado directamente al ARN. Por otro lado, 5-FdUMP en presencia de folato reducido, inhibe a la Timidilato Sintetasa y depleciona el *pool* de dTTP, precursor necesario para la síntesis de

ADN. Alternativamente, este último puede ser fosforilado a 5-FdUTP e incorporado directamente al ADN. Esta incorporación errónea inhibe la elongación de la cadena y altera su estabilidad, lo que resulta en la producción de roturas de una hebra y fragmentación del ADN (Falcone et al., 1998; Otake et al., 1999).

Esta encrucijada metabólica no depende únicamente de las enzimas que intervienen en ella de forma directa, sino de genes como *p53*, *MDR1* o genes de reparación del ADN dañado, cuya funcionalidad es clave para determinar la sensibilidad y respuesta en cada célula expuesta a la droga. En el caso de líneas celulares con genotipo normal para *p53* se ha descrito mayor sensibilidad al tratamiento con 5-FU, mientras que aquellas con deficiencia funcional de *p53* son resistentes. Asimismo, se han asociado tumores colorrectales *p53* silvestres con una mayor sensibilidad a 5-FU (Mariadason et al., 2003). Estos datos corroborarían los ensayos de Chu y colaboradores (1999), cuyos resultados sugerían que *p53* inhibe la expresión de *TYMS* bloqueando la unión de factores de transcripción. Parece que la expresión de *p53* en líneas celulares y tumores humanos se correlaciona con la respuesta a 5-FU. No obstante, existen estudios muy recientes que determinan que la sensibilidad a 5-FU en líneas celulares *p53* silvestres no está directamente relacionada con *TYMS*, sino con la enzima dUTPasa, que hidroliza dUTP a dUMP. Este dUMP es el sustrato de TS, necesario para la síntesis de Timidinas (dTTP). En este estudio señalan que *p53* regula negativamente la expresión de esta enzima y provoca la depleción del sustrato de TS. Esta ausencia de sustrato conlleva una autoinhibición de la expresión de *TYMS*, y por tanto, mayor sensibilidad a 5-FU. Además, parece ser que este mecanismo se encuentra favorecido por el tratamiento con oxaliplatino, que es realmente el factor inhibidor de la dUTPasa (Wilson et al., 2009).

Por todo ello, consideramos de gran importancia determinar cuáles son los marcadores de respuesta y sensibilidad a 5-FU en líneas celulares, y posteriormente realizar un estudio traslacional que permita predecir respuesta a 5-FU en pacientes a partir de su patrón genético individual.

5.1.3.1. Niveles de citotoxicidad en líneas tratadas con 5-FU/oxaliplatino

En este análisis el objetivo radicaba en esclarecer la posible respuesta diferencial al cabo de 24, 48 y 72 horas de exposición a 5-FU solo y combinado con oxaliplatino a diferentes concentraciones y en diversas líneas celulares tumorales humanas.

Parece que la muerte celular por apoptosis en líneas sensibles (SW480) se producía a dosis mínimas de 5-FU (5uM). Mientras, en líneas resistentes (SW620) eran necesarias dosis bastante elevadas (50uM) para apreciar la tinción de células apoptóticas tanto por citometría de flujo como por TUNEL.

Las citometrías señalaron que el mayor efecto de la droga se producía al cabo de 48 horas en líneas sensibles. Seguidamente, aumentaba la proporción de células apoptóticas y se

agravaba el efecto a las 72 horas. Mientras, en las líneas resistentes, aunque la frecuencia de células vivas disminuía ligeramente a las 48 horas de tratamiento, más tarde se observaba una recuperación de la viabilidad celular. Estos datos no fueron compatibles con los obtenidos por ensayos de MTT, donde se observaba una recuperación de la población tras la exposición prolongada a dosis elevadas de 5-FU tanto en líneas sensibles como resistentes. Por otro lado, en los ensayos de MTT tampoco se observaba la disminución de la población de células resistentes tras 48 horas en cultivo, sino que había un aumento con respecto a las 24 horas. Parece, por tanto, que el IC50 no es representativo de lo que se observa después *in vitro* en escalados de dosis-tiempo, al menos para experimentos relativamente largos. En base a estos resultados, consideramos la hipótesis de una resistencia acumulativa. Es decir, en los cultivos celulares de las líneas tratadas con 5-FU, se produce un efecto acumulativo a través del cual algunas líneas en principio sensibles podrían volverse resistentes tras tan solo 48 horas de exposición al fármaco. Es decir, las células resistentes se seleccionarían por acumulación de dosis.

Por otro lado, se observó una mayor tasa de necrosis dependiente de dosis en células resistentes que en las sensibles. Estos datos parecen indicar que la muerte celular en líneas sensibles a 5-FU se produce preferentemente por mecanismos apoptóticos, mientras que en líneas resistentes es debida, en mayor medida, a procesos necróticos.

La hipótesis de partida radicaba en que el número de células apoptóticas crecía gradualmente a medida que se aumenta la dosis de 5-FU cuando se tratan líneas sensibles a la droga. Pero sólo se observaron diferencias significativas en la frecuencia de células apoptóticas tratadas con 5-FU respecto al control en la línea resistente SW620 a las 24 horas de tratamiento. El hecho de no observar tales diferencias a las 48 ni a las 72 horas, podría ser debido a múltiples factores:

- las células se encontraban mayoritariamente en fase S según las curvas de crecimiento. Esto implica que estaban en la fase de mayor expresión de Timidilato Sintasa. Esta enzima es la diana principal de acción del 5-FU, por lo que las células serían más sensibles a la actividad del fármaco.
- Es posible que los mecanismos de resistencia a la droga se activen tras 24 horas de exposición.
- Otra posibilidad es que el aumento de células apoptóticas observado se deba a un efecto acumulativo de la apoptosis que aparece significativamente a las 24 horas de tratamiento.

Un hecho llamativo fue que en algunas líneas celulares de colon, tanto sensibles como resistentes a 5-FU (SW620 y SW480), se producía un aumento de tamaño y complejidad celular cuando eran tratadas con dosis excesivas tanto de 5-FU como de oxaliplatino. Este fenómeno posiblemente es consecuencia de una desregulación de los mecanismos celulares y

acumulación de cuerpos apoptóticos en el citoplasma celular. Aunque también es probable que exista un desequilibrio osmótico debido al aumento de permeabilidad de la membrana citoplasmática. Es posible que el aumento de tamaño, más destacable en líneas resistentes a partir de 50 μ M de 5-FU, sea producto de la acumulación de estos cuerpos apoptóticos.

En cambio, en líneas sensibles a 5-FU, era más llamativo el aumento de complejidad que experimentaban las células tratadas con altas dosis de 5-FU. Este dato resulta coherente con la propuesta activación de mecanismos de defensa contra el agente nocivo, que aumentarían la complejidad estructural de la célula.

El hecho de que este aumento de tamaño y complejidad no se observara en todas las líneas ensayadas es una incógnita aún por resolver, ya que con los análisis que hemos realizado no hemos conseguido encontrar indicios que puedan explicar de manera convincente este fenómeno.

Las drogas dirigidas contra la Timidilato Sintetasa se focalizan en la apoptosis como mecanismo principal de inhibición de crecimiento. Puesto que nuestro objetivo principal era esclarecer los componentes de la resistencia a 5-FU, se enfocaron algunos experimentos *in vitro* en la inducción de apoptosis a través del tratamiento con diferentes dosis de este agente. Los resultados indicaron que no se observaba apoptosis en líneas celulares resistentes tras 48 o 72 horas de exposición. Sin embargo sí se observó un aumento en el porcentaje de células necróticas a medida que se incrementaba la concentración o el tiempo de exposición a 5-FU.

Algunos autores han descrito que la respuesta apoptótica a inhibidores de *TYMS* es dependiente de caspasas, y promovida por *NF κ B*. Se ha descrito que algunas células malignas tienen constitutivamente activado *NF κ B*, incluso muchos agentes anticancerosos promueven su activación (Hinz et al., 2001), lo que podría ser la causa del fenotipo resistente de muchos tumores. Por el contrario, la respuesta tipo necrosis es independiente tanto de caspasas como de la modulación por *NF κ B* (Harbour et al., 2008). Aun así, no podemos descartar otros mecanismos de muerte celular no apoptótica como autofagocitosis o catástrofe mitótica.

Como hemos mencionado en este mismo apartado, los resultados de las citometrías parecían indicar que las líneas celulares resistentes a 5-FU ensayadas no sufrían un proceso apoptótico sino necrótico. Sería recomendable esclarecer los mecanismos de muerte celular que tienen lugar en estas líneas, comprobando la activación de las distintas cascadas de caspasas y otras proteínas proapoptóticas. Adicionalmente, se podría analizar la activación de las distintas fases de la vía intrínseca de apoptosis, p. ej. estudiar la liberación de citocromo C mitocondrial por microscopía confocal. Igualmente, se podrían hacer ensayos de inhibición *in vitro* con ARNs de interferencia, para comprobar en nuestras líneas celulares la activación diferencial de caspasas. Asimismo, sería de gran utilidad analizar el estado de metilación de algunas caspasas como la caspasa 8, cuya hipermetilación se ha descrito previamente en tumores de colon. Por otro lado, resultaría considerablemente informativo analizar la

activación de proteínas implicadas en procesos de autofagia celular, como DAPK, o de catástrofe mitótica y necrosis celular.

A largo plazo, se podrían efectuar pruebas de inhibición de *NFkB* en *xenotransplantes* de tumores humanos en ratón y comprobar si los tumores originados a partir de inoculación de células resistentes se vuelven sensibles a 5-FU.

A la luz de los resultados obtenidos en estos ensayos, llegamos a la conclusión de que la evasión de la apoptosis podría ser uno de los mecanismos claves de resistencia a esta droga en tumores de pacientes.

Conviene señalar que la resistencia a apoptosis inducida por 5-FU en este ensayo puede verse sobreestimada por la exposición a este agente que, particularmente a dosis muy altas, podría resultar en una toxicidad inespecífica y fallo celular con posterior apoptosis. Es decir, de modo paralelo a la necrosis, las células resistentes podrían sufrir apoptosis cuando la dosis de 5-FU administrada es excesiva.

5.1.3.2. Patrones de ciclo celular en líneas tratadas con 5-FU/oxaliplatino

En este proyecto nos propusimos dilucidar el posible efecto diferencial sobre las fases del ciclo celular al cabo de 24, 48 y 72 horas de exposición a 5-FU solo y combinado con oxaliplatino a diferentes concentraciones y en diversas líneas celulares tumorales humanas.

Los análisis por citometría de flujo indicaron que en líneas resistentes a 5-FU, se producía una parada del ciclo celular en el límite G1/S. En cambio, las líneas celulares sensibles tendían a acumularse en fase G2/M. Esta acumulación crecía de forma dependiente de dosis en ambos casos.

Una de las consecuencias del tratamiento con 5-FU es el daño al ADN. Dado que la progresión del ciclo celular está regulada por puntos de control o *checkpoints* en la fase G0 o G1 y G2 del ciclo, este daño reduce la progresión de la fase S, sin llegar a detener por completo el ciclo celular (Sankar et al., 2004). Una parada en fase G1 o G2 permite reparar el daño antes de la replicación o mitosis, respectivamente, de manera que el fallo en la reparación puede llevar a la célula a sufrir un proceso de apoptosis, catástrofe mitótica o senescencia.

Cuando analizamos la asociación entre el patrón de ciclo celular y el genotipo de *p53* en cada línea celular, no encontramos ninguna significancia. Únicamente se ha podido determinar esta asociación en la línea SW48, dado que SW620, la otra línea del panel resistente a 5-FU, tiene genotipo *p53* mutante. Es importante destacar que no se observaron diferencias significativas a nivel de ARNm, sólo de proteína, lo que indica que el ARNm de *p53* no sirve, en cualquier caso, como factor predictivo de respuesta a 5-FU.

5.1.3.2.1. Efecto beneficioso del oxaliplatino en la terapia basada en 5-Fluorouracilo

Cuando se administraban 5-FU y oxaliplatino a la vez, parecía existir una sinergia entre ambos. En líneas resistentes a 5-FU no se producía parada en el límite G1/S como ocurría al tratar sólo con este agente, sino acumulación en la fase S del ciclo. Es decir, añadir oxaliplatino tendría un efecto beneficioso para el tratamiento basado en 5-FU, porque aumenta la sensibilidad del cultivo.

Puesto que el 5-FU actúa en la fase S del ciclo celular, la parada en G1, anterior ésta, evita que la droga pueda actuar. La adición de oxaliplatino al medio provoca que las células continúen su ciclo normal y el 5-FU puede actuar sobre ellas una vez que entran en fase de síntesis. Estos datos eran coherentes con los resultados de citotoxicidad, en los que se observó un aumento del proceso apoptótico al tratar con ambos agentes simultáneamente.

Parece, por tanto, que la acción del oxaliplatino como inhibidor de la parada en G1 favorece la acción del 5-FU, quien provoca la muerte celular por apoptosis. Este argumento también apoya los datos publicados por Boyer y colaboradores (2004), quienes indicaban que las líneas celulares *p53* mutantes, paraban el ciclo celular en fase S, mientras que las *p53 wild type* paraban en G2/M.

Aunque la reciente publicación de Wilson y colaboradores propone una explicación más plausible para este efecto beneficioso del oxaliplatino en terapias con 5-FU. El oxaliplatino inhibe la expresión de la dUTPasa a través de *p53*. Esta enzima es la responsable de la síntesis de dUMP, sustrato de *TYMS*. La depleción de los niveles de sustrato provoca una autoinhibición de la expresión de *TYMS* y por tanto, una mejora en la respuesta a 5-FU (Wilson et al., 2009).

5.1.3.2.2. El papel que desempeña *p53* en la parada del ciclo celular

En nuestros análisis sobre la línea SW620, que tiene genotipo *p53* mutante, la parada del ciclo celular tenía lugar en fase S. En cambio, las líneas sensibles a 5-FU con *p53* silvestre, como HCT-116, se detenían en fase en G2/M.

Otras publicaciones habían señalado que la detención en el límite G1/S en líneas celulares aparecía acompañada por un incremento en los niveles de la proteína TP53, sugiriendo que la parada podría estar mediada por dicha proteína (Chu et al., 1999; Wong et al., 2001; Mariadason et al., 2003; Yu et al., 2008). Además, existen registros del papel principal que juega *p53* como mediador en la respuesta al ADN dañado: parada del ciclo celular e inducción de apoptosis o de senescencia (Shah et al., 2001; Taylor et al., 2001; Bunz et al., 1999).

Ante estos datos, sería aconsejable ampliar el panel de líneas *p53* normales resistentes a 5-FU, incluyendo líneas resistentes a 5-FU *per se* u otras líneas de colon resistentes generadas por exposición continuada a dosis crecientes del fármaco. Aunque no se puedan establecer asociaciones estadísticas, se ha descrito que SW48 presenta hipermetilación de promotores de genes proapoptóticos (Morita et al., 2006) así como de genes reparadores de ADN, reguladores de ciclo celular, etc. Por tanto, sería interesante tratar esta línea con agentes desmetilantes con el propósito de averiguar si existe sinergismo con 5-Fluorouracilo. Los resultados serían triviales en aras de trasladar este esquema de tratamiento a pacientes con cáncer colorrectal, al igual que se utilizan para tratar otras neoplasias.

La hipótesis de partida residía en que la disrupción del *poo/* de pirimidinas producida por el tratamiento con 5-FU en líneas *p53* mutantes, podría desencadenar un mecanismo alternativo de resistencia capaz de inhibir la progresión hacia fase S. También podría evitar la inducción de enzimas que promueven la transición G1/S. Esto último protegería las células de la incorporación de nucleótidos erróneos y de la acumulación de daño en el ADN. Aun así, sabíamos que la parada del ciclo celular no podía depender únicamente del estado de *p53*, ya que líneas celulares como SW480 carecen de actividad funcional de esta proteína (Goyette et al., 1992). Además, algunos autores habían visto que no se producía parada en G1 cuando se irradiaban estas células (Kastan et al., 1992), a pesar de que la irradiación se asocia con parada del ciclo celular en G1 por mecanismos dependientes de *p53*.

En este estudio también observamos el caso contrario, es decir, líneas celulares con *p53* mutado también eran capaces de entrar en apoptosis y paralizar su ciclo celular en el límite G1/S, evitando la incorporación del antimetabolito tóxico y desarrollando resistencia a la droga. Esta parada del ciclo celular podría estar mediada por otros genes, como *MDR1*, que se inducirían con el tratamiento basado en 5-FU (Chin et al., 1992).

A lo largo del tiempo se han descubierto diversos mecanismos de apoptosis independientes de *p53*, así como de evasión de la misma. De hecho, estudios previos *in vitro* habían señalado que algunos agentes quimioterapéuticos como paclitaxel, vinblastina, vincristina y doxorubicina pueden activar el factor regulador de la transcripción *NFkB*, que modula el proceso de muerte celular programada, lo que generaría potencialmente supresión de la apoptosis en células resistentes (Wang et al., 1996; Das et al., 1997). Estos datos refuerzan la importancia de los experimentos mencionados en el apartado anterior con el fin de descifrar los componentes de la resistencia a 5-FU en líneas celulares.

5.1.3.2.3. Ciclo celular y expresión génica

La actividad de *TYMS* se encuentra regulada a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (Johnson et al., 1994; Ayusawa et al., 1986). Al igual que otros genes que codifican proteínas de fase S, *TYMS* se encuentra regulado a nivel transcripcional por *E2F1* (DeGregori et al., 1995).

Los mismos cultivos en los que se realizó el estudio de ciclo celular por citometría de flujo fueron los que se utilizaron para el estudio de expresión de ARNm de *TYMS* por RT-PCR cuantitativa. En líneas resistentes, la acumulación en fase G1 coincidía con una disminución en la expresión de *TYMS*. Probablemente esta sea la relación principal con el fenotipo de resistencia. La acumulación en fase G1, donde la expresión de *TYMS* es menor, protege a la célula de la acción principal del 5-FU, es decir, la inhibición de la síntesis de ADN.

Las células sensibles a 5-FU, por el contrario, atravesaban el límite fase G1 tardía-S temprana, coincidiendo con los niveles más elevados de expresión de ARNm de *TYMS*. En este hecho radicaría la sensibilidad de estas células, puesto que 5-FU actúa inhibiendo a *TYMS*.

La sincronización de las células en fase G1/S puede estar relacionada con el inicio del proceso de muerte celular programada. Existen datos publicados que correlacionan la sensibilidad al tratamiento con 5-FU y el inicio de la apoptosis (Wadler et al., 1998). De hecho, aquellos experimentos permitieron observar mediante microscopía de fluorescencia que las células más sensibles a 5-FU mostraban condensación de la cromatina. En los datos de TUNEL encontramos que el porcentaje de células positivas era mucho mayor en líneas sensibles a 5-FU que en líneas resistentes. Además, este porcentaje aumentaba de forma dosis-dependiente con la exposición a 5-FU. A este respecto, algunos autores han descrito que la cantidad de células que presentan fragmentación del ADN también se asocian con un aumento de sensibilidad a la droga (Wadler et al., 1998). En relación con el estado de fragmentación del ADN, sería de gran utilidad realizar análisis de la fragmentación del ADN en geles de agarosa (*DNA laddering* y *Comet assays*).

Por tanto, los parámetros del ciclo celular se pueden usar como marcadores predictivos de respuesta a 5-FU como complemento al valor predictivo de la expresión y genotipo de *TYMS*. Incluso desde un punto de vista clínico, se podría combinar el 5-Fluorouracilo con agentes que paren las células en fase S, del mismo modo que se usa la colchicina en cultivos celulares. Este agente no puede usarse en clínica debido a su alta toxicidad sistémica, pero podría diseñarse otro con el mismo efecto que optimizaría la eficacia del 5-FU. En esta misma línea se encuentra orientado el esquema de tratamiento 5-FU+oxaliplatino que se utiliza de forma habitual en pacientes con cáncer colorrectal. El daño en el ADN inducido por derivados del platino produce una parada transitoria del ciclo celular en fase S, por medio de la inhibición de algunas ciclinas. Por tanto, el oxaliplatino favorece la transición de fase G1 a

fase S, donde tiene su acción principal el 5-Fluorouracilo. Por ello, la combinación de ambos provoca un efecto sinérgico.

Además, se vio que algunas líneas resistentes, como SW620, sobreexpresaban *DPYD* que podría actuar sobre la eliminación del 5-FU de la célula, y permitir la continuidad del ciclo celular hacia fase S. Una vez que las células están en fase S, las alteraciones en los ratios de nucleótidos causadas por fármacos antimetabolito pueden resultar en una acumulación de ADN dañado, que llevaría a la apoptosis (en el caso de células sensibles) o bien a una muerte celular no apoptótica (en el caso de células resistentes).

Alternativamente, se comprobó que la mayoría de las líneas celulares sensibles a 5-FU no se detenían en fase G1, sino que continuaban el ciclo y se detenían en la fase G2/M. Esta parada les permitiría sobrevivir a través de la prevención o reparación de este ADN dañado, como se describió anteriormente (Wadler et al., 1998).

Por otro lado, las células resistentes a 5-FU detenían su ciclo celular en el límite G1/S. De esta forma, evitan la incorporación errónea de nucleótidos durante la síntesis de ADN.

En la línea resistente a 5-FU (SW620) se observó un dato llamativo al cabo de 48 horas, la proporción de células que estaban en fase G1 cuando eran tratadas con dosis inferiores a 50uM de 5-FU o con 50uM durante 24 horas, pasaban a acumularse en fase S. Pero si la dosis o el tiempo de exposición eran superiores, este efecto no se observaba, es decir, seguían estando en fase G1. Este punto de inflexión coincidía con un pico de expresión de ARNm de *DPYD*. Puesto que DPD es la enzima que cataboliza el 5-FU, es posible su sobreexpresión sea causa o efecto de este avance en el ciclo celular. El exceso de droga podría inducir la sobreexpresión de la enzima que ha de eliminarlo o, por el contrario, la sobreexpresión de la enzima permite catabolizar el 5-FU y favorece la progresión normal del ciclo celular. Esta teoría se apoya en el dato obtenido tras las 72 horas de exposición, donde se observó que la cantidad de ARNm de *DPYD* era muy superior en células SW620 tratadas con altas dosis de 5-FU respecto a las no tratadas o expuestas a dosis muy bajas. Puesto que sólo encontramos este efecto en la línea celular resistente SW620 y la otra línea resistente de este estudio, SW48, presentaba metilación aberrante en el promotor de *DPYD*, sería informativo comprobar si se cumple esta relación de expresión en otras líneas de colon resistentes a 5-FU o en SW48 tras someter el cultivo a agentes desmetilantes.

5.1.3.2.4. Variaciones en la ploidía celular en líneas celulares expuestas a 5-Fluorouracilo/Oxaliplatino

Se observó que las líneas celulares aneuploides tratadas con 5-FU, perdían la frecuencia de aneuploidías conforme aumentaba la dosis de la droga, de manera que a 500uM toda la población era diploide. Este hallazgo se confirmó de forma similar en líneas celulares sensibles y resistentes a 5-FU, independientemente de su patrón genético o epigenético.

Es posible que las células con mayor carga de ADN sean más sensibles a 5-FU, puesto que es un agente que se intercala en los ácidos nucleicos. Por tanto, en las células tetraploides, por ejemplo, habría doble cantidad de moléculas de 5-FdUTP incorporadas en el ARNm y de dUTP en el ADN. Este hecho produciría el doble de citotoxicidad en estas células que en las diploides. De algún modo, la diploidía sería una ventaja selectiva para resistir al tratamiento.

Asimismo, se observó un aumento de formación de agregados celulares conforme se incrementaba la concentración de la droga. Este dato parece apoyar la teoría de la alteración de la homeostasis celular por el 5-FU. Es posible que se activen mecanismos de adherencia como respuesta defensiva ante el daño producido por el 5-FU.

5.1.4. Perfiles de metilación en las líneas celulares analizadas

La regulación epigenética es un punto clave en el proceso carcinogénico. En una célula sana, la pauta de metilación se conserva fielmente a través de las divisiones celulares, sin afectar la expresión de ciertos grupos de genes característicos de cada tipo celular, y bloqueando aquellos genes que deban permanecer silenciados (Jones et al., 1999; Baylin et al., 2001; Esteller et al., 2002). Por ello, nos planteamos analizar el estado de metilación de los genes implicados en la ruta del 5-Fluorouracilo y del ácido fólico, así como genes de reparación del ADN y otros genes supresores de tumores.

Comprobamos que el promotor de *p16* se encontraba hipermetilado o hemimetilado en casi todas las líneas, excepto en un 10% de ellas, donde se encontró deleción. En ambos casos el efecto sobre la transcripción del gen sería similar, por lo que se pone de manifiesto su papel esencial en la superación de la senescencia en líneas celulares en cultivo. Sin embargo, se ha descrito que la sobreexpresión de *p73* se asocia con un pronóstico desfavorable en cáncer y esto se debe a que es también un factor angiogénico (Guan et al., 2003), por lo que la modulación epigenética será de vital importancia en la expansión clonal.

p14^{ARF}, *p15^{IN4b}*, *p16^{IN4a}* y *p73* son genes supresores de tumores y observamos que, en ocasiones, también se encontraban metilados en nuestra población muestral. Existía un 9.1% de las líneas que tenían deleción homocigótica de *p14^{ARF}*, *p15^{IN4b}* y *p16^{IN4a}*. Es importante señalar que ninguna de estas líneas era de colon. Quizás por esto los resultados fueron tan diferentes de los que se describirán más tarde en pacientes, donde la metilación aberrante de *p14^{ARF}* y *p16^{IN4a}* se presentaba, aproximadamente, en una cuarta parte de la población de cáncer colorrectal.

En el caso de la isla en el promotor de *MGMT*, el estado de metilación aberrante era muy superior en células, donde se presentaba en más del 40% de las líneas, con respecto a la población de pacientes, donde sólo se encontró metilación en un 25% de los individuos. El estado hipermetilado del promotor de *MGMT* se podría asociar con un fenotipo de incrementada susceptibilidad a las mutaciones, y por ello, generar mutaciones en genes

asociados a cáncer. De hecho, la mayoría de las líneas con este gen metilado tenían mutaciones en alguno de los genes de las rutas de reparación NER y BER.

Las diferencias en los resultados de pacientes y líneas celulares pueden ser debidas, en parte, a la diferencia de tamaño muestral en ambos estudios, y a que las líneas utilizadas no eran únicamente de colon, mientras que los pacientes sí lo eran. Por lo que sería recomendable ampliar el número de líneas de colon.

Un dato muy importante en el desarrollo de esta investigación fue la evaluación del estado de metilación de los genes de la ruta del 5-FU (*TYMS*, *TP* y *DPYD*). Estos genes presentan islas CpG en sus promotores y encontramos que también están regulados epigenéticamente. Esto podría permitir que su expresión pueda ser inducida cuando son tratados con 5-Fluorouracilo *in vitro*. Hasta donde hemos alcanzado a investigar, no hemos tenido conocimiento de ningún documento que reporte la metilación aberrante de los promotores de *TYMS* y *TP*. Sin duda, se trata de un fenómeno de gran relevancia que merece ser estudiado en profundidad en una mayor cohorte de líneas celulares y muestras de pacientes.

Es un hecho que la respuesta a terapia basada en 5-FU presenta un sinfín de grados de respuesta y toxicidad en pacientes de cáncer de colon. En este estudio centrado en la farmacogenómica, pretendíamos establecer un tratamiento individualizado para cada paciente en función del estado de sus genes. Este estado engloba tanto polimorfismos, como expresión y otras características fundamentales como el estado de metilación de las islas CpG presentes en sus promotores. El descubrimiento de la existencia de una regulación a nivel epigenético en los genes de la ruta metabólica del 5-FU abre una puerta hacia la esperanza de encontrar una combinación idónea para tratar cada tumor. El estado hipermetilado en que se encuentran, a veces, *TYMS*, *TP* y *DPYD*, conlleva su silenciamiento. Este silenciamiento se ha asociado con una peor respuesta al tratamiento en pacientes, como veremos más adelante, y una menor sensibilidad en líneas celulares *in vitro*. Por tanto, la posibilidad de combinar el esquema 5-FU/oxaliplatino con un agente desmetilante como el 5-Aza-2'-desoxicitidina, es una nueva línea a explorar en el camino hacia el desarrollo del tratamiento individualizado. Algunos de estos agentes desmetilantes ya se utilizan para tratar otros tipos de neoplasias, con resultados favorables (Lubbert et al., 2000).

Las modificaciones principales que presenta una célula tumoral combinan los fenómenos de hipometilación generalizada de dinucleótidos CpG dispersos que deberían estar metilados en circunstancias no patológicas, con la hipermetilación de islas CpG en los promotores de ciertos genes. La citada hipometilación en ocasiones se asocia con la reactivación de secuencias endoparasíticas y desarrollo de inestabilidad cromosómica. Por su parte, la hipermetilación de promotores de genes supresores de tumores, conlleva su silenciamiento (Jones et al., 1999; Baylin et al., 2001). Aunque muchos tumores comparten las mismas alteraciones en genes concretos, los datos recopilados durante los últimos años

permiten asignar perfiles únicos de hipermetilación de promotores a cada tipo tumoral y celular (Esteller et al., 2001).

Desde el punto de vista práctico, las líneas celulares son una herramienta experimental de gran utilidad para la investigación en cáncer, puesto que son accesibles, de fácil manejo y conveniencia para someterlas a distintos tratamientos o procesos de ingeniería molecular. Por este motivo es necesario asociar la situación epigenética ya descrita (Paz et al., 2003) y comprobar si el estado de metilación de ciertos genes viene asociado con algún otro parámetro de respuesta a 5-FU.

No obstante, para realizar comparaciones con significancia estadística, debería ampliarse el tamaño muestral de líneas celulares y, sobre todo, deberían incluirse muchas más líneas de cáncer colorrectal a fin de poder confrontarlas con los patrones de metilación en pacientes.

También es destacable la fidelidad y adecuación de las líneas celulares establecidas de cáncer humano como modelos para la búsqueda y ensayo de nuevos agentes desmetilantes. Sobre todo, en cuanto a la potencial asociación entre respuesta a 5-FU y el estado de metilación de los genes implicados en su ruta metabólica.

5.1.4.1. Relación entre polimorfismos en genes del metabolismo de grupos metilo y patrón de metilación de líneas celulares

A diferencia de lo que ocurría en pacientes (como veremos en el apartado 5.2 de Discusión), los polimorfismos en genes del metabolismo de grupos metilo, no revelaron ninguna relación significativa con la hipermetilación de islas CpG ni con el contenido de 5-mC del ADN. Estos resultados son coherentes con el hecho de que las líneas celulares de cáncer establecidas se cultivan con medios que contienen enormes cantidades de folatos, del precursor S-adenosilmetionina (SAM), y son más independientes del ambiente externo relacionado con la metilación o de factores dietéticos.

El folato proporciona unidades de carbono para diversas reacciones bioquímicas, entre ellas la producción de SAM, el donador universal de grupos metilo, que también provee de grupos metilo a las citosinas en el ADN. También parece existir una relación entre la escasez de folatos y cáncer (Fowler et al., 1998). No obstante, aún no es posible vincular la hipometilación generada por una deficiencia de folatos y el cáncer, aunque todos los estudios apoyan la importancia de una dieta rica en folatos para reducir el riesgo de ciertos tipos tumorales (Kim et al., 1999).

Consecuentemente, la menor actividad enzimática de los genes del metabolismo de grupos metilo determinada por variantes alélicas, que conllevaría una menor generación de SAM, queda enmascarada por el suministro en exceso del medio de cultivo, como se había descrito anteriormente (Paz et al., 2002)

5.1.4.2. Patrones de metilación de los genes implicados en la ruta metabólica del 5-FU: *TYMS*, *TP* y *DPYD*

Los análisis de metilación de los genes que participan en la ruta metabólica del 5-Fluorouracilo en líneas celulares indicaron que, en general, las islas de los promotores de *TYMS* y *DPYD* no se encuentran metiladas. Sin embargo, hallamos un dato de gran relevancia entre las 17 líneas estudiadas, ya que casi la mitad de ellas presentaban, al menos, un alelo del gen *TP* metilado.

Puesto que *TP* es la principal enzima de activación del 5-FU, postulamos la posibilidad de que la metilación aberrante de su promotor favoreciera una menor sensibilidad a la droga. Sin embargo, en DLD-1, línea sensible a 5-FU, el promotor se encontró hipermetilado en ambos alelos, dato que resulta novedoso en la bibliografía. Los informes de RT-PCR cuantitativa manifestaron expresión de la enzima *TP* tanto en líneas con la isla CpG del promotor hemimetilada como en DLD1, que presentaba metilación de las dos copias. Por tanto, parece que la metilación del promotor de *TP* no afecta a su expresión.

El caso de la línea SW48 resultó de especial interés porque presentaba hipermetilación aberrante del promotor de *DPYD* junto con los promotores de *TYMS* y *TP* hemimetilados. Posiblemente aquí radica la clave de la baja sensibilidad que presenta esta línea al tratamiento con 5-FU. Puede que la célula, ante la incapacidad de metabolizar el 5-FU por la metilación de *DPYD*, lo expulse hacia el exterior. SW48 es una línea con alta tasa de metilación aberrante de los promotores analizados. Presentaba metilación aberrante del gen reparador *MGMT* y en los genes supresores de tumores *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}* y *p73*, por lo que parece una línea con bastante agresividad tumoral. Posiblemente, todo ello contribuye a la menor sensibilidad observada al tratamiento con 5-Fluorouracilo. Dado que existe expresión de *TYMS* en estas células, parece que la metilación no silenciaba el gen, si bien podría tener un papel en algún tipo de regulación transcripcional. Dado que únicamente en esta línea se encontró metilación aberrante de *TYMS*, sería conveniente ampliar el estudio y comprobar la expresión después de tratar el cultivo con agentes desmetilantes. De este modo podríamos dilucidar si los polimorfismos en el promotor de *TYMS* guardan algún tipo de relación con el estado de metilación.

El dato llamativo de la sobreexpresión de *TP* en SW48 es que tiene el promotor de este gen hemimetilado. Por tanto, la expresión debería estar reducida. La sobreexpresión sugiere que la dosis elevada de 5-FU revierte el silenciamiento de *TP* así como la resistencia a la droga. Este hallazgo sienta las bases para una combinación con agentes desmetilantes en aquellos pacientes que presentan metilados los genes de la ruta metabólica del 5-Fluorouracilo.

También es posible que exista un mecanismo alternativo que sólo tras 48 horas de tratamiento provoca la sobreexpresión de *TP* en esta línea pero no se mantiene a las 72 horas (donde la transcripción se reduce nuevamente). Otra opción es que se produzca un

efecto acumulativo a 500uM de 5-FU, es decir, que la sobreexpresión sea transitoria y no relacionada con la metilación. Quizás el hecho de que no esté metilado totalmente le permite ser objeto de otro tipo de regulación transcripcional alternativa que provoca este pico a las 48 horas, o el efecto reversible por acumulación de dosis al sobreexpresarse a 500uM. Tampoco podemos descartar que se trate de una cualidad específica de esta línea celular u otros mecanismos reguladores de la expresión de estos genes que no hemos contemplado en este estudio.

5.1.5. Polimorfismos genéticos y expresión de ARNm y proteína de las enzimas que participan en la respuesta a 5-FU. Valor pronóstico de respuesta y sensibilidad al tratamiento

Los polimorfismos genéticos, a través de su influencia sobre los niveles de expresión enzimáticos, pueden asociarse con sensibilidad y respuesta a la terapia basada en 5-FU/oxaliplatino. Por ello, decidimos estudiar los niveles de expresión de aquellos genes implicados en la ruta metabólica del 5-Fluorouracilo y del ácido fólico así como de otros genes cuya expresión repercute en la respuesta y sensibilidad a 5-FU.

5.1.5.1. Niveles de ARNm de MTHFR en líneas celulares tratadas con 5-FU

En las líneas celulares analizadas, se observó una disminución en los niveles de ARNm de *MTHFR* al tratar con 5-FU. Una posible teoría para explicar esta deducción podría tener su origen en la autorregulación de la transcripción. El 5-FU utiliza el sustrato de *MTHFR* como cofactor para formar el complejo ternario que inhibe a la Timidilato Sintasa, y la ausencia de sustrato provocaría excedente de enzima, que desencadenaría un proceso de autoinhibición de *MTHFR* mediante un *feed-back* negativo. Este efecto quedaría revertido al retirar la droga del medio.

En el caso de los cultivos que fueron tratados con dosis relativamente altas, se incrementaban los niveles de ARNm de *MTHFR*. Lo más probable es que la sobreexpresión de la enzima sea un mecanismo respuesta para reequilibrar el *poo*/de folato circulante y, sobre todo, para mantener el equilibrio normal del donador de metilación SAM de la célula una vez que se ha retirado el agente. Esta afirmación se apoya en ciertas publicaciones anteriores (Chang et al., 2006). Este patrón de respuesta tiene lugar sobre todo en líneas homocigotas normales 677CC; las heterocigotas y las dobles mutantes 677TT tienen menor actividad de la enzima MTHFR de forma intrínseca, por lo que al retirar la droga del medio únicamente se restablece la expresión, no se sobreexpresa por encima del control, puesto que en el medio de cultivo, rico en folato, no es necesario. Por otro lado, se trata de una reacción limitante y

también reversible en esta ruta metabólica. Nuestros datos indicaron también que la inhibición de su transcripción es transitoria y reversible, independientemente del alelotipo, ya que el polimorfismo afecta a la proteína y no a la transcripción. Estos aumentos de expresión de *MTHFR* ante la ausencia de droga, se correspondían con picos de expresión de ARNm de *TP*, que podría indicar que la presencia de 5-FU puede inducir la expresión de sus activadores, y su ausencia, el silenciamiento de los mismos. Por otro lado, una deficiencia en la forma de folato intracelular 5,10-metilenTHF puede venir asociada a un decremento en la disponibilidad de grupos metilo para uracilos. Esta depleción causaría menor disponibilidad de timina y resultaría en una incorporación de uracilo en el ADN. La consecuencia final es que favorecería la aparición de roturas, un efecto directo del tratamiento con 5-FU. Indirectamente, los bajos niveles de folato circulante producen defectos en la metilación del ADN y una descondensación de la cromatina que promueve inestabilidad de microsatélites. A este respecto, algunos autores han asociado carcinogénesis de tumores MSI negativos aneuploides con la deficiencia de folato al compararlos con tumores diploides (Chang et al., 2006).

Un dato a destacar es que la expresión de ARNm de *MTHFR* en heterocigotos no se elevaba a concentraciones de 50uM, sino a 500uM. Este genotipo representaría entonces el punto medio entre ambos homocigotos, de manera que una dosis baja de 5-FU les ayuda a eliminar el 5,10-MTHF excedente, pero el exceso de dosis desequilibraría los niveles de folato y del donador de grupos metilos, SAM. El exceso de 5-FU captaría todo el sustrato disponible e inhibiría la síntesis de folato, menos importante al tratarse de un cultivo. Sin embargo, el segundo efecto de este exceso de droga es la inhibición de la síntesis de SAM, donador universal de grupos metilo, por lo que se podría desregular el mecanismo de metilación del ADN. Es posible que al retirar la droga sobreexpresen el ARNm de *MTHFR* para recuperar la homeostasis. El papel del metabolismo del folato en la carcinogénesis colorrectal es muy importante, puesto que para determinar predisposición son más decisivos los niveles adecuados de folato que los polimorfismos de *MTHFR* (Chang et al., 2006).

Como ya hemos comentado anteriormente, en nuestros análisis las líneas celulares aneuploides tratadas con altas dosis de 5-FU eran diferencialmente eliminadas. Únicamente quedaban células diploides. Primeramente atribuimos esta selección a una mayor citotoxicidad por incorporación de nucleótidos erróneos en los ácidos nucleicos. Pero también es posible que la selección a favor de células diploides venga originada por el secuestro de 5,10-metilenTHF en el complejo ternario con 5-FU y *TYMS*. La explicación radicaría en que los niveles de folato en células diploides son relativamente mayores, como publicaron Chang y colaboradores (Chang et al., 2006). Por tanto, las células diploides pueden mantenerse con mayor ventaja que las aneuploides en un medio rico en 5-FU.

5.1.5.1.1. Asociación entre los niveles de expresión de ARNm de MTHFR y metilación de islas CpG

Cuando se valoraron únicamente los niveles de expresión de ARNm, sin tener en cuenta polimorfismos, se observó que el incremento de expresión de *MTHFR* tras retirar la droga coincidía, en algunas líneas celulares sensibles y resistentes, con un aumento en los niveles de ARNm de *TP*. *TP* es la enzima anabolizante de 5-FU, lo que parece indicar que la droga inducía la expresión de sus propios activadores. Particularmente, la línea resistente a 5-FU SW48, incrementaba los niveles de ARNm de *TYMS*, *TP*, *MTHFR*, *E2F1* y *RFC*, mientras que disminuía los niveles de *DPYD* tras permanecer 72 horas con medio normal en aquellos cultivos que habían sido tratados con concentraciones de 500uM de 5-FU, pero no en los tratados con dosis menores. SW48 tiene metilado el promotor de *DPYD*, como ya indicamos anteriormente, y como está publicado en la bibliografía (Sato et al., 2006). Además, presenta metilación aberrante de los promotores de *TYMS* y *TP*. Por eso resultó llamativo el hallazgo de la sobreexpresión de *TP* en SW48 al tratar con dosis elevadas de 5-FU. Como el promotor de *TP* en SW48 está hemimetilado, parece necesaria la metilación de ambas copias u otros mecanismos epigenéticos accesorios para silenciar la expresión de este gen.

Por otro lado, la sobreexpresión en SW48 de *RFC*, transportador de folato reducido, podría ser una consecuencia derivada del exceso de folato que conlleva la sobreexpresión de *TYMS* y *MTHFR*. Esta teoría se apoya en los datos publicados recientemente (Iférgan et al., 2008).

La sobreexpresión de genes hemimetilados sugiere que las dosis altas de tratamiento revierten el silenciamiento (así como la resistencia a 5FU) y sienta las bases para una combinación con agentes demetilantes en aquellos pactes que presentan metilados los genes de la ruta metabólica del 5-FU. Estos cambios en el mecanismo de regulación de la metilación de genes pueden ser indicio de una adaptación celular a la presión selectiva provocada por el tratamiento. Esta hipótesis se confirmaría por el hecho de encontrar otros genes implicados en la misma ruta metabólica del 5-FU también aberrantemente metilados, como *TYMS* y *TP*. Aunque no queda claro que el tratamiento pueda producir respuesta a nivel de metilación. Es posible que dicha alteración en el mecanismo epigenético sea una respuesta indirecta a otros mecanismos desregulados por el tratamiento.

5.1.5.2. Niveles de ARNm de TYMS en líneas celulares tratadas con 5-FU

La Timidilato Sintetasa juega un papel crítico en la regulación del ciclo celular y en el proceso de apoptosis a través de su efecto regulatorio de la expresión de *p53* y quizás, de otras proteínas involucradas en ciclo celular (Liu et al., 2002). La habilidad de *TYMS* para

funcionar como regulador traduccional puede tener importantes consecuencias en el desarrollo de resistencia a drogas anticancerosas. De hecho, la actividad de esta enzima puede verse modificada por diversas causas como mutaciones, polimorfismos, nivel de fosforilación y localización subcelular. Estos procesos no modifican necesariamente los niveles de proteína, pero sí pueden afectar a su funcionalidad y al valor pronóstico de la misma (Samsonoff et al., 1997; Poon et al., 1994; Horie et al., 1995; Berger SH et al., 1988).

La respuesta al tratamiento basado en 5-Fluorouracilo depende de múltiples factores genéticos. Por ello, se analizó la expresión de diversos genes de la ruta metabólica del 5-FU y del folato, así como *p53* y genes de resistencia a drogas.

5.1.5.2.1. Asociación entre los niveles de expresión de ARNm de *TYMS* y *E2F1*

Uno de los factores de transcripción que regula la expresión de Timidilato Sintetasa es *E2F1*. Sin embargo, la relación entre la expresión de ambos genes no está muy clara, aunque parece que *E2F1* induce genes cuyas proteínas actúan en fase S, entre ellas TS (DeGregori et al., 1995). Incluso, en algunas líneas celulares de fibrosarcoma se ha asociado la sobreexpresión de *E2F1* con resistencia a 5-FU por regulación positiva de la expresión de *TYMS*.

Nuestros resultados fueron negativos tanto en términos de correlación entre el factor de transcripción *E2F1* y *TYMS* como en predicción de respuesta al tratamiento. Aun así, resultaría de gran utilidad realizar un análisis de la expresión proteica mediante Western blot, así como del estado de acetilación de la proteína E2F1 en cada línea, ya que parece que la actividad de este factor de transcripción se encuentra regulada por el estado de acetilación, y que la forma acetilada tiene mayor capacidad de unión al ADN (Marzio et al., 2000; Martínez-Balbas et al., 2000). Puede que sea posible establecer un lazo entre el nivel de *E2F1* acetilado, la expresión de *TYMS* y la respuesta al tratamiento. No obstante, la técnica resultaría poco viable en términos económicos y se emplearía demasiado tiempo como para utilizarla de rutina en clínica.

Las diferencias de expresión entre tratamientos se hacían más patentes, en general, tras retirar la droga del medio, lo que se traduce en una respuesta celular a la presión ejercida por el 5-FU.

5.1.5.2.2. Asociación entre los niveles de expresión de ARNm de *TYMS* y *TP*

Encontramos que la expresión de TS correlacionaba positivamente con la expresión de TP a nivel de ARNm. Estudios previos demostraron que TS correlacionaba también de forma positiva, a nivel de proteína, con la expresión de VEGF (van Triest et al., 2000), un

compuesto de gran importancia en el proceso metastático. Parece, por tanto, que la enzima de activación del 5-FU, TP, coincide en el tiempo con la máxima expresión de TS. No obstante, los resultados sugieren que ambos sucesos convergen por la acción de 5-FU. Es decir, en las células que no se trataron con 5-FU, no tenía lugar esta correlación entre TS y TP. Una vez más, los datos nos llevan a pensar que el 5-FU induce la expresión de su activador, TP. Esto explicaría que en el momento de máxima expresión de TS, que es cuando actúa el 5-FU, se incrementen también los niveles de TP, la enzima responsable de su anabolismo. De hecho, encontramos algunas líneas en las que TP se regulaba negativamente tras retirar la droga del medio.

5.1.5.2.3. Asociación entre los niveles de expresión de ARNm de *TYMS* y *DPYD*

DPD es la enzima responsable del catabolismo de 5-FU. En nuestros análisis de expresión de ARNm por qRT-PCR, vimos que la expresión de *DPYD* apenas variaba con los tiempos de exposición, excepto casos puntuales.

En algunos casos donde *TP* se inhibía tras retirar la droga del medio, se observó una sobreexpresión de *DPYD*. Estos datos podrían ser esperables puesto que *DPYD* se encarga de mantener el equilibrio en el metabolismo del 5-FU. No obstante, la expresión de *DPYD* varía dependiendo del tejido y de la línea celular (Van Kuilenburg et al., 2005), por lo que también sería informativo analizar los polimorfismos que presenta cada línea celular para este gen, dado que también influyen en los niveles de expresión.

5.1.5.3. Correlación entre los niveles de ARNm y proteína de *TYMS*

Anteriormente se había descrito cierta ausencia de correlación entre los niveles de ARNm de *TYMS* y la cantidad de proteína encontrada en tumores humanos (Johnston et al., 1995). Cuando realizamos la comprobación en líneas celulares, se encontró una correlación positiva, lo que podría indicar que las condiciones fisiológicas, así como el grado de diferenciación tumoral, afectan a los niveles de expresión proteica como se definió anteriormente (Johnston et al., 1997-b). También es posible que la toma de muestra de ARNm y proteína se produjera en sitios alejados del tumor, y la heterogeneidad de éste hace que se observen grandes diferencias. Esta información es trivial para su aplicación en clínica. Las biopsias tumorales contienen cantidades bajas de ARNm pero las cantidades de proteína son aún más pobres.

Es importante señalar que, según nuestros resultados, es posible analizar la expresión de *TYMS* a partir de ARNm para determinar la resistencia a 5-FU. Los ensayos *in vitro* indicaban un aumento de expresión de *TYMS* de forma dependiente de dosis al tratar con 5-FU. No

obstante, la mayor parte de las líneas analizadas no tenían el alelotipo 3G, por lo que resultaría de gran interés ampliar el panel de muestras y reafirmar este hallazgo. Es importante recordar que este alelo se asocia con niveles de expresión de 2 a 4 veces superiores a los otros dos (3C y 2R respectivamente). Además, el medio de cultivo es rico en nutrientes, y es importante destacar que algunos de ellos, como el folato, juegan un papel decisivo en la regulación de la Timidilato Sintetasa. Por tanto, será necesario trasladar este ensayo a los tumores de pacientes, en los que los niveles de folato no están en exceso y el factor dieta introduce una variabilidad en los reservorios celulares.

Tradicionalmente, la detección y cuantificación de proteína TS en tejidos humanos se ha realizado mediante ensayos de actividad enzimática, lo que suponía una gran limitación cuando se aplicaba a la actividad de *TYMS* en biopsias tumorales humanas, puesto que no se detectaban niveles muy bajos de expresión (Swain et al., 1989).

En nuestros ensayos *in vitro*, los niveles de proteína TS aumentaban de forma dosis-dependiente con la exposición a 5-FU, lo que nos llevó a pensar que la cantidad intrínseca de TS en tumores antes del tratamiento así como la habilidad del tumor para sobreexpresar de forma aguda la enzima, pueden jugar un papel muy importante en el desarrollo de resistencia del tumor al fármaco.

Para comprobar si los niveles intrínsecos de *TYMS* en tumores se asocian con la posterior resistencia a 5-Fluorouracilo, sería necesario cuantificar los niveles de proteína antes y después del tratamiento. Se podría hacer en cultivos *in vitro* o generar xenotransplantes en ratones *nude* a partir de líneas tumorales de colon que muestren claramente esta relación. Posteriormente se podría realizar la tinción inmunohistoquímica del tumor con anticuerpo anti-TS para ver si la proteína se transloca al núcleo al elevar la dosis de 5-FU.

Del mismo modo, se podría evaluar la expresión proteica de *TP* antes y después del tratamiento con 5-FU y comprobar si se induce por éste.

5.1.5.4. Expresión nuclear de *TYMS*

La Timidilato Sintasa es una enzima de síntesis de Timidina. Por su función, la localización normal de esta enzima es el citoplasma celular.

En las tinciones con el anticuerpo anti-TS advertimos que el 5-FU parecía inducir la translocación de la proteína TS al núcleo celular cuando era administrado en altas dosis. Este hallazgo encierra una gran importancia en la investigación de sensibilidad y respuesta a 5-FU, puesto que esta localización subcelular impide que la enzima pueda ser incluida en el complejo ternario (5-FU + 5,10-MTHF + TS). Además, por primera vez en la literatura científica, observamos que esta translocación se hacía más acusada al incrementar la dosis de la droga. El dato más novedoso en nuestros experimentos fue la demostración de que dicha translocación sólo tenía lugar a partir de dosis de 50uM de 5-FU.

Parece que el propio tratamiento desencadena un proceso defensivo en la célula, que “secuestra” a la proteína dentro del núcleo para que no pueda ser inactivada por el 5-FdUMP o por *p53*. La consecuencia más directa de este “secuestro” en el núcleo de TS, necesaria para la síntesis de ADN, es la detención del ciclo celular. No hay que olvidar que TS es una enzima limitante en la síntesis de novo de timidina, nucleótido necesario para la duplicación del ADN. En este caso, la célula pararía su ciclo celular en el límite G1/S pero no moriría, y éste es, precisamente, el efecto que vimos por citometría en líneas celulares resistentes con genotipo *p53* silvestre. En la literatura se ha establecido una asociación entre el incremento de expresión nuclear de *TYMS* y respuesta pobre a terapia basada en 5-FU tras numerosos ensayos inmunohistoquímicos y también mediante técnicas bioquímicas, como qRT-PCR (Peters et al., 1994; Johnston et al., 1995; Lenz et al., 1998; Paradiso et al., 2000).

Asimismo, sería interesante ampliar los estudios que llevamos a cabo en pacientes. Es decir, comparar los niveles de expresión de proteína de TS con las características clinicopatológicas del tumor, como lateralidad o estadio. Este interés radica en algunas publicaciones donde se ha descrito que las metástasis podrían presentar expresión nuclear incrementada de *TYMS*. Ésta tendría un papel putativo a modo de regulador de algunas proteínas oncogénicas, como c-myc (Chu et al., 1995; Wong et al., 2001).

El siguiente paso de nuestro proyecto será el estudio inmunohistoquímico en tumores de pacientes para comprobar si existe expresión nuclear y sus implicaciones en la respuesta al tratamiento con 5-FU, así como la posible autoregulación por *TYMS* de su propia expresión mediante este fenómeno.

5.4.1.5. Correlación entre los niveles de ARNm y proteína de *TYMS* y *p53*

Anteriormente se ha indicado que existen evidencias de interacción entre *TYMS* y *p53*, aunque los resultados son muy controvertidos. Algunos investigadores han sugerido que la proteína TS se une al ARNm de *p53*, formando un complejo ribonucleoprotéico que bloquea la traducción de *p53* (Chu et al., 1999). Contrariamente, existen evidencias de que tumores con altos niveles de *TYMS* también sobreexpresan *p53*, y parece que este patrón viene determinado por la localización del tumor (Lenz et al., 1998). Sin embargo, la explicación de la existencia de una asociación entre las proteínas TS y TP53 *in vivo* es complicada. La proteína TP53 silvestre puede, a su vez, inhibir la actividad promotora de *TYMS* bloqueando sus factores de transcripción (Lee et al., 1997). De hecho, esta segunda interacción explicaría mejor las observaciones *in vivo* de algunas publicaciones anteriores donde pacientes con *p53* mutado tienen sobreexpresión de proteína TS asociada con un incremento de ARNm de *TYMS* y proteína TP53 citoplasmática (Chu et al., 1995; Lenz et al., 1998; Paradiso et al., 2000). Para completar este razonamiento, nos apoyamos en los resultados de Western blot que obtuvimos en algunas líneas celulares *p53 wild type* como A549, donde se observaba un

nítido incremento de proteína TP53 nuclear cuando TS se traslocaba al núcleo. En cambio, en líneas con *p53* alterado, como DLD1, la expresión protéica de *p53* nuclear no estaba influida por TS, mientras que la expresión citoplasmática aumentaba a la vez que ésta.

La existencia de registros donde aparecía expresión de TS nuclear en algunos tipos celulares, incluso dentro de tejidos normales (Bissoon-Haqqani et al., 2006), indica que TS puede tener una función reguladora. De hecho, está documentado que la proteína TS es una proteína de unión a ARNm y se une activamente a *p53*, genes de la familia *myc*, quinesinas, etc (Liu et al., 2002). Es posible que la proteína TS se transloque al núcleo cuando la célula es expuesta a dosis exageradas de 5-FU para unirse al ARNm de *p53* y bloquearlo, de este modo evitaría la entrada en apoptosis característica de la respuesta a 5-FU. Otra posibilidad es que cuando la célula se trata con 5-FU, se altere la capacidad de unión de la proteína TS al ARNm, ya sea el suyo propio o el de otros genes como *p53* o *c-myc*. Esto explicaría el aumento de expresión de *p53* que se observa a grandes dosis de 5-FU junto a la sobreexpresión de *TYMS*, que no puede inhibir su traducción a través del *feed-back* negativo.

En algunas líneas celulares *p53* mutantes, como HCC1937 y HT29, no observamos translocación al núcleo de TS, ni si quiera al tratar con 500uM de 5-FU. Puede que por eso estas líneas fueran menos sensibles a 5-FU que las de genotipo normal, como ya indicaron otros autores (Lowe et al., 1993; Lowe et al., 1994). En cambio, en otras líneas *p53* mutantes sí se producía translocación de proteína TS al núcleo. En éstas se produciría un mecanismo de apoptosis independiente de *p53*, que podría ser inducido por sobreexpresión de genes pro-apoptóticos, como caspasa 3 o *c-myc*, a cuyo ARNm también se ha descrito que se une la proteína TS. Este dato estaría respaldado por algunos estudios en los que se ha descrito que únicamente los pacientes con sobreexpresión de *c-myc* y *p53* silvestre son capaces de responder a la terapia basada en 5-FU, mientras que los que sobreexpresan *c-myc* pero son *p53* mutantes muestran una respuesta mucho más pobre (Arango et al., 2001). Por tanto, la sobreexpresión de *c-myc* podría ser otra diana para nuevas estrategias terapéuticas (Pennisi et al., 1998). Por otro lado, la apoptosis independiente de *p53* podría estar mediada por *E2F1*, *p73* o *p21* (Liu et al., 2006).

Los resultados de Western blot sugerían que complejo ternario no parece translocarse al núcleo. Este dato se observó en todos los tipos celulares ensayados y con todas las dosis de 5-FU administradas. No sabemos si debido a la conformación de la proteína TS cuando forma parte de éste o a la incapacidad de 5-dUMP para atravesar la membrana celular. No parece posible que el paso de TS se deba a una simple despolarización de la membrana nuclear, sino que debe de estar mediado por transportadores específicos de membrana.

Barajamos diversas posibilidades para explicar este hallazgo. La razón más plausible podría ser el mencionado papel de *TYMS* como regulador de *p53*. Para que la proteína pueda unirse al ARNm de *p53* es necesario que ésta esté libre, y no formando parte del complejo ternario. Por otro lado, es posible que en la célula, como mecanismo de defensa

ante la exposición a 5-FU, se induzca la entrada de proteína TS libre en el núcleo con el fin de protegerla de la acción del fármaco.

Para ratificar estos resultados, se trasladaron estos experimentos a tumores colorrectales. El fin último era comprobar si existe asociación con la localización del tumor en el paciente, puesto que algunos autores aseguran que los tumores de lado izquierdo manifiestan sobreexpresión de *p53* y *TYMS* con mucha más frecuencia y son más recurrentes que los del lado derecho (Lenz et al., 1998). Mientras, otros asocian la sobreexpresión de *TYMS* con tumores de colon ascendente (Wong et al., 2001).

DISCUSIÓN II: PACIENTES

5.2.1. Caracterización de los tumores atendiendo a factores clinicopatológicos e influencia de estos factores en la respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo

La población de estudio constaba de 156 pacientes, 94 varones y 62 mujeres, de edades comprendidas entre los 35 y los 68 años. 143 pacientes presentaban cáncer de colon, y sobre ellos se llevó a cabo un estudio poblacional para evaluar la respuesta y tolerancia a quimioterapia basada en 5-Fluorouracilo. Dicha evaluación se llevó a cabo mediante la caracterización de algunos *parámetros clínicos*, como la edad del individuo, tipo de dieta, ingesta de alcohol etc.; *parámetros clinicopatológicos*, como estadio y localización del tumor; y *parámetros moleculares*, entre ellos polimorfismos de diversos genes de la ruta del 5-FU y asociados con la respuesta al mismo y perfil epigenético en genes supresores de tumores. El factor dieta tiene gran influencia en la respuesta a 5-FU, sobre todo en relación con los niveles de folato que se ingieren. El 5-Fluorouracilo interviene en la ruta del ácido fólico, a través de MTHFR, enzima cuyo sustrato tiene funcionalidad de cofactor en la inhibición de la Timidilato Sintasa por 5-FU (Danenberget al., 1977). La ruta metabólica del folato está ligada a la ruta del metabolismo de grupos metilo a través de MTHFR y de MS (Metionina Sintasa), responsable de la síntesis de SAM (S-Adenosilmetionina), donador universal de grupos metilo y determinante del perfil epigenético de los tejidos tumorales y normales (Ulrich et al., 1999).

En la población de estudio, el 95% de los tumores que respondían al tratamiento con 5-FU presentaban estadios A-B de Duke. Pese a las publicaciones que postulan que la respuesta al tratamiento con 5-FU empeora cuanto más joven es el paciente (Mulcahy et al., 1994; Shankar and Taylor., 1998; Colorectal Cancer Collaborative Group, 2000), es lógico pensar que los tumores en estadios tempranos sean más fáciles de combatir, puesto que *a priori* están menos malignizados. En este estudio, de hecho, no hemos encontrado una asociación significativa entre la edad de los pacientes y el tipo de respuesta al tratamiento ($p=0.1508$). La respuesta podría estar asociada al estadio en que se encuentra el tumor en el momento del diagnóstico ($\chi^2 p<0.0001$) y no a la edad biológica del individuo. Para el primer supuesto sí se encontró una relación estadísticamente significativa, mientras que no se pudo asociar la edad del individuo con la respuesta a la terapia. No hay que olvidar que el cáncer colorrectal es un cáncer común y que un gran número de pacientes sufren enfermedad recurrente tras la resección potencialmente curativa, por lo que el uso de un parámetro como la supervivencia global puede llevar a resultados erróneos (McMillan et al., 2008). La supervivencia en pacientes de cáncer colorrectal es menor cuanto más joven es el paciente (Behbehani et al., 1985). Sin embargo, estos resultados no eran consistentes con ninguno de los estudios ajustados para casos mezclados (McMillan et al., 2008). Por eso, una de las propuestas del presente estudio era establecer si las diferencias en respuesta asociadas con la edad eran debidas en realidad a otros factores distintos de ésta. Por causa de la rareza de

esta enfermedad en la juventud, el diagnóstico suele verse retrasado (Pitluk et al., 1976). Este hecho, junto con la mayor frecuencia de tumores pobremente diferenciados y mucinosos en la población joven, puede contribuir a que la respuesta en dicha población sea pobre (Howard et al., 1975). Se sabe que el carcinoma de colon en pacientes jóvenes tiene un mal pronóstico. Esto puede deberse a múltiples factores, incluyendo la aparición tardía de síntomas que llevan a un diagnóstico retrasado (Miller et al., 1967). Además, puede ser que las diferencias en el comportamiento biológico den lugar a tumores más agresivos que se presenten en estadios muy avanzados en el momento del diagnóstico (Johnson et al., 1959; Recio et al., 1965). Así como un mayor porcentaje de tumores pobremente diferenciados y mucinosos en la población más joven (Bedikian et al., 1981). Sería interesante comparar el comportamiento biológico del cáncer colorrectal en ambos grupos de edad mediante la técnica de xenotransplantes de células establecidas de tumores de colon humanas en ratones *nude* que carecen de sistema inmune, doblando el tiempo de permanencia del tumor en el animal y analizando los parámetros clinicopatológicos y de respuesta a 5-FU (Bodgen et al., 1978). Por tanto, en estudios futuros en esos pacientes sería recomendable especificar la asociación entre los diversos factores y supervivencia específica al cáncer y no relacionada con él por separado. Es decir, que la supervivencia se mediría como supervivencia libre de enfermedad. Y la no supervivencia se contabilizaría únicamente cuando la causa de la muerte es la enfermedad. Pero no implica supervivencia a otros factores, entre los que pueden encontrarse efectos secundarios del tratamiento. En esta tesis, puesto que es en gran medida un estudio prospectivo, el seguimiento de los pacientes es aún a corto plazo, y la tasa de respuesta se mide en remisión del tamaño tumoral cuya revisión tiene lugar cada dos meses.

A pesar de que no existe una razón aparente, muchos investigadores concluyeron anteriormente que el carcinoma de colon es más común en hombres que en mujeres, en una proporción aproximada de 1.5:1 (Dukes, 1940; McMillan et al., 2008). En nuestro caso, este dato se cumple, puesto que los pacientes masculinos suponen un 60% del total, frente a un 40% de mujeres. Sin embargo, el porcentaje de mujeres menores de 45 años es de un 53% aproximadamente, mientras que los hombres suponen un 47%. Aunque no es significativa, esta diferencia corrobora los resultados de Duke que indicaban que los carcinomas colorrectales ocurren a edades más tempranas en mujeres que en hombres (Ezzo et al., 1958). Cabe argumentar que la histopatología de los tumores sí que puede depender del sexo o de la edad del paciente. De manera que en pacientes jóvenes y en mujeres es más frecuente que el tumor sea de tipo mucinoso y pobremente diferenciado (Howard et al., 1975; Koo et al., 2008). Además, en mujeres es más frecuente la localización proximal del tumor y la inestabilidad de microsatélites (Popat et al., 2005). En la población objeto de este estudio, parece haber relativamente menor número de mujeres con cáncer colorrectal entre los mayores de 45 años que en la población más joven (37% *vs* 32.9%). Esta tendencia ya se había observado en otros estudios (Behbehani et al., 1985), aunque no es estadísticamente significativa. Otros autores han demostrado que la supervivencia global en mujeres es mayor

que en varones debido a la protección estrogénica. Los receptores de estrógenos del epitelio del colon inhiben el crecimiento de las células cancerosas (Lointier et al., 1992).

Por otro lado, todos los pacientes que presentaban tumores en estadíos C-D de Dukes eran mayores de 45 años, lo que parece apoyar la hipótesis de que los estadíos del tumor se asocian a la edad del paciente. Por otro lado, la agresividad del tumor se correlaciona con su tasa de crecimiento. La alta incidencia de tumores mucinosos en pacientes jóvenes, que es cuatro veces más común que en la población adulta, y la gran incidencia de tumores pobremente diferenciados en la población joven, está documentada en la bibliografía anterior a este estudio (Recalde et al., 1971; Williams et al., 1954). Esto demuestra que un dato relevante a considerar en estudios futuros es el grado de diferenciación e histología del tumor.

5.2.1.1. Influencia de factores clinicopatológicos y parámetros moleculares de los tumores sobre la respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo

5.2.1.1.1. Localización y estadío

El colon es la última porción del sistema digestivo, mediante la cual se eliminan agua, sales y residuos sólidos. En humanos el colon consta de cuatro secciones: colon ascendente, colon transversal, colon descendente y sigma. El colon transversal y descendente se conoce como colon derecho o proximal, y el resto es colon izquierdo o distal (Anatomía de Gray, 1858). Ambas partes son diferentes a nivel celular y bioquímico, tienen distinta expresión de antígenos, diferente vascularización, metabolismo de glucosa, composición y densidad de flora bacteriana (Bufill et al., 1990). Además, al contrario que el izquierdo, el colon derecho suele estar poco diferenciado y tiene fenotipo mucinoso, gran incidencia de inestabilidad de microsátélites y baja tasa de mutación de *p53* (Bufill et al., 1990).

En primer lugar, se procedió a analizar la influencia de la localización anatómica del tumor sobre la incidencia de las características clinicopatológicas del mismo. Existían evidencias previas que sugerían que los tumores de colon distal y proximal diferían no sólo en incidencia en cuanto a localización anatómica, sino en cuanto a edad y sexo del paciente y características moleculares biológicas. En la población de nuestro estudio, el 65.9% (test Fisher p -value=0.0493) de los pacientes con tumores de colon en el lado izquierdo (colon descendente o distal) mostraron Estadíos A-B de Dukes, es decir, la enfermedad estaba menos avanzada. Al mismo tiempo, existe una mayor incidencia de tumores en estadíos prematuros en poblaciones jóvenes. También se encontró que la subpoblación mayor de 45 años tenía una respuesta pobre a la terapia basada en 5-FU.

Aproximadamente un 60% de los cánceres colorrectales en áreas de gran incidencia se localizan en la zona distal, mientras que hay predominancia de tumores proximales en zonas

de baja incidencia (Haenszel et al., 1973). Otros estudios han relacionado la edad del paciente con la localización anatómica del tumor, destacando que los tumores proximales se diagnostican a edades más avanzadas (Pitluk et al., 1983), aunque en el presente estudio no se ha encontrado una relación estadísticamente significativa en esta asociación. Este hallazgo podría explicarse por el hecho de que los tumores en el lado izquierdo tienen una sintomatología más fácilmente detectable, puesto que está en la parte final del colon, casi en el recto, y manifiestan con mayor facilidad sangrados u otras alteraciones. Del mismo modo se podría explicar que los tumores proximales se diagnostiquen a edades más avanzadas, puesto que en los primeros años de la enfermedad no se detectan síntomas (Deng et al., 2008).

Cuando se realizó el ANOVA de dos vías para comprobar si esta relación entre lateralidad y estadío estaba sesgada por las variables género o edad, no se apreciaron diferencias significativas. Es decir, en este estudio no aparece relación ni tendencia entre la localización del tumor y la edad del individuo. Este hecho también puede deberse a que la media de edad del ensayo es menor que la media general de pacientes de cáncer colorrectal, que suele estar entre los 60 y 70 años. De hecho, en el presente estudio apenas hubo pacientes que presentaran tumores en estadío D de Dukes. Colon ascendente y descendente tienen distinta expresión génica, y ésta viene determinada desde el estado embrionario del individuo (Oleg et al., 2003). Además, cabe pensar que la edad favorece la acumulación de mutaciones tanto a un lado como al otro. Pero es cierto que el colon izquierdo, por ser el tramo final del mismo, se encuentra en contacto con mayor número de toxinas que el derecho, lo que lleva a que la incidencia a este lado sea mayor.

5.2.1.1.2. El efecto de la dieta sobre la respuesta a 5-FU

La dieta es fundamental en la evaluación de respuesta a la terapia basada en 5-FU puesto que es determinante de los niveles de folato circulantes. La enzima responsable de la síntesis de folato a partir de 5,10-MTHF es la Metilentetrahidrofolato Reductasa. Cuando el sustrato de esta enzima actúa como cofactor de 5-FU, o cuando el gen *MTHFR* presenta alguno de los polimorfismos estudiados, el reservorio de folato celular se depleciona. Esto reduce la síntesis de SAM, donador universal de grupos metilo, y desregula el mecanismo de metilación celular (Paz et al., 2002). El 5-Fluorouracilo inhibe a la Timidilato Sintetasa, que es una enzima limitante en la síntesis del folato circulante. De este modo, pudimos observar que aquellos pacientes con baja ingesta de folatos, presentaban una respuesta pobre al tratamiento. Este hecho pone de manifiesto la relevancia de los hábitos del paciente antes y durante el tratamiento sobre la respuesta al mismo, y el beneficio terapéutico manifiesto derivado simplemente del control de la dieta y los hábitos no saludables, como ingesta de alcohol. La depleción de folato incrementa los niveles de TS de 2 a 3 veces, haciendo que los tumores sean resistentes al tratamiento con 5-FU (Van der Wilt et al., 2001).

Por otro lado, el folato proporciona unidades de carbono para diversas reacciones bioquímicas, entre ellas la producción de S-Adenosilmetionina (SAM), necesaria para conservar el estado adecuado de metilación de numerosos genes. Ante la falta de este agente, se desregularían múltiples reacciones metabólicas, entre ellas la metilación del ADN. Asimismo, la falta de SAM favorecería la hipometilación global del genoma, que favorecería el crecimiento o progresión tumoral a través de la reactivación de genes silenciados por metilación y secuencias endoparasitarias.

Paralelamente, los pacientes menores de 45 años mostraban una frecuencia de islas CpG de genes superiores de tumores metiladas de manera aberrante inferior al 18.2% (<2/11 islas analizadas) mientras que los mayores de 45 tenían una frecuencia superior (>2/11 islas analizadas). Este dato parece apoyar que la edad favorece la hipermetilación de islas CpG ya que en diversos estudios han concluido que algunas islas CpG se metilan con el envejecimiento celular (Brandelis, 1994, Klein 1991, Macleod 1984). El nivel de hipometilación global del genoma está estrechamente relacionado con el grado de malignidad, aunque este factor es dependiente del tipo tumoral. En algunos tipos tumorales, como los de mama y ovario, la pérdida progresiva de 5-metilcitosina se relaciona directamente con el aumento del grado de malignidad (Qu et al., 1999; Gama-Sosa et al., 1983; Narayan et al., 1998). Es decir, la cantidad de 5-mC podría servir como marcador biológico con valor pronóstico, aunque en nuestra población no hemos podido establecer dicha relación; no encontramos una asociación significativa entre el estadio tumoral y el contenido en 5-mC.

Existen otros factores sobre los que podría influir la dieta (o cualquiera de las múltiples variables estudiadas en este trabajo) y que sería interesante explorar especialmente en los que respecta a la asociación de la forma de administración del tratamiento, y para ello nos planteamos ampliar el estudio con mayor número de muestras. El tratamiento de 5-FU tiene 3 formas de administración frecuentes: por vía intravenosa en infusión continua, en bolo o administración oral. Cada una de ellas, se relaciona con un metabolismo diferente, y por ello el papel de la dieta y del nivel de folatos puede ser determinante en el tipo y grado de toxicidad asociado a cada forma de administración. Incluso no es descartable el hecho de que cada forma de administración se pudiese asociar a distintas probabilidades de respuesta en función de la dieta, o de muchas otras variables genéticas, epigenéticas y moleculares. Para determinar con precisión la validez de estas especulaciones, se requiere ampliar el tamaño muestral con pacientes asociados a cada esquema terapéutico, y evaluar todas las variables de este estudio nuevamente.

5.2.1.1.3. Inestabilidad de microsatélites (MSI)

La inestabilidad de microsatélites es una consagrada característica de los cánceres colorrectales hereditarios y se asocia con tumores agresivos, con fenotipo metilador,

pobrementemente diferenciados y con localización proximal (Jass et al., 1998; Kim et al., 1994). Por ello, tratamos de asociar la inestabilidad de microsatélites con algunas características clínicas y moleculares de los tumores, así como con un patrón de respuesta determinado.

En este estudio no se ha podido asociar el estado de metilación ni la inestabilidad de microsatélites con la respuesta a la terapia basada en 5-FU. Por tanto, no podemos afirmar que los tumores MSI positivos sean más agresivos como se afirmó anteriormente (Kim et al., 2005) o que, por el contrario, tengan mejor pronóstico o respuesta, como verificaron Ohtani y colaboradores. (Ohtani H et al., 2000). Existe una gran controversia acerca de estas afirmaciones, pero parece que la relación entre MSI y la respuesta a la terapia viene determinada por la recurrencia, metástasis y relación con cáncer de colon familiar. Para utilizar MSI como factor predictivo de respuesta, sería necesario discernir si la respuesta se debe a alguno de los otros factores y no a MSI. Para ello, tendrían que incluirse otros parámetros de estudio como la presencia de metástasis y caracterización epigenética de las mismas, recurrencia de la enfermedad, carácter esporádico o familiar de la misma y características histopatológicas. Posiblemente la explicación esté relacionada con que los tumores que son MSI positivos por tener *hMLH1* mutado o su promotor metilado, son por tanto deficientes en el sistema de reparación (MMR), por lo que el daño producido por el 5-FU en el ADN no puede ser reparado correctamente. En tumores MSI positivo con el sistema MMR defectuoso, se activan los mecanismos de apoptosis como respuesta al ADN dañado por el 5-FU que no puede ser reparado y la célula tumoral muere (Michael-Robinson et al., 2001). Este hecho hace que, a pesar de que los tumores sean más agresivos y tengan mayor estadio, metástasis, capacidad invasiva y antiogénica, etc, respondan mejor al tratamiento.

El fenotipo inestabilidad de microsatélites (MSI+), ocurre en aproximadamente el 10-15% de los CRC y surge de un defecto en el sistema de reparación MMR. Esta frecuencia se corresponde con la encontrada en nuestra población de estudio, que fue de un 15% de tumores MSI+ aproximadamente. La gran mayoría de los casos MSI+ ocurren en cáncer colorrectal esporádico y se asocian con silenciamiento transcripcional inducido por metilación del gen reparador *hMLH1* (Jass et al., 2002). Son muchos los grupos que han examinado el significado pronóstico de tumores CRC MSI+. La mayoría presagiaba excelente supervivencia en pacientes con tumores MSI+ cuando se trataban con 5-FU debido al defecto en el sistema de reparación MMR que conduce a la célula hacia la apoptosis (Hemminiki et al., 2000; Watanabe et al., 2001; Liang et al., 2002; Brueckl et al., 2003). Aunque dos estudios en pacientes más jóvenes no encontraron esta asociación (Ribic et al., 2003; Carethers et al., 2004). Una posible explicación para esta discordancia es la fuente de los pacientes incluidos en estos estudios. Según algunos autores, los casos más jóvenes MSI+ y aquellos con cáncer colorrectal hereditario no polipósico, tienen más probabilidad de contener en línea germinal o somáticamente mutados los genes *hMLH1* y *MSH2*, mientras los casos de mayor edad MSI+ casi siempre son consecuencia de la metilación aberrante del promotor de *hMLH1* (Iacopetta et al., 2003). Esos dos grupos MSI+ probablemente comparten el mismo fenotipo con respecto

a MMR defectuoso, ya sea por mutación o por silenciamiento epigenético de *hMLH1*. Sin embargo, la metilación aberrante del ADN detectada en los pacientes de más edad se podría asociar con un fenotipo biológico distinto del de los pacientes con el promotor de *hMLH1* no metilado. Este fenotipo distinto podría incluir una respuesta diferente a 5-FU. Por tanto, se podría utilizar el estado metilado aberrante de *hMLH1* como factor predictivo de respuesta a 5-FU en pacientes de más edad.

En esta tesis, al comparar la inestabilidad de microsatélites de los distintos grupos de edad y sexos, no se observaron resultados significativos para ninguna de las dos variables. Recientemente, se ha postulado que existe una relación directa entre mujeres menores de 45 años y la alteración en el sistema de reparación del ADN (MMR), así como una alta frecuencia en inestabilidad de microsatélites (MSI-H) (Park et al., 2007). En cuanto a la localización del tumor, no encontramos asociaciones significativas con la inestabilidad de microsatélites. Estos datos no apoyan los estudios de Breivik y colaboradores, quienes determinaron que la incidencia de MSI en los tumores de colon proximales era hasta diez veces superior que los en distales (Breivik et al., 1997). Sin embargo, nuestros resultados son coherentes con los que obtuvieron otros investigadores al analizar la inestabilidad de microsatélites con respecto a las características clinicopatológicas de los pacientes (Philp et al., 2000), donde tampoco se encontraron asociaciones significativas. No obstante, la población de estudio tiene una media de edad de 54 años, por lo que no es de extrañar que no se hayan encontrado asociaciones significativas con la Inestabilidad de Microsatélites, más frecuente en la edad avanzada. Por tanto, lo ideal sería aumentar la subpoblación de mayor edad para establecer la significancia. Por otro lado, hay que añadir que las publicaciones en las que se obtuvieron resultados reveladores eran sobre poblaciones orientales, por lo que es posible que estas diferencias sean de etiología racial.

5.2.2. Caracterización epigenética de los tumores e influencia de la hipermetilación aberrante en la respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo

5.2.2.1. Fenotipo metilador (CIMP)

El fenotipo metilador de islas CpG (CIMP+) se ha descrito como una característica de tumores que tienden a presentar inactivación epigenética de ciertos genes supresores de tumores. Los tumores considerados CIMP positivos en este estudio son los que presentan hipermetilación aberrante de al menos dos *loci* de entre *hMLH1*, *p16*, *p14*, *MGMT*, *MINT1*, *MINT2* y *MINT31*.

La ruta metabólica del 5-FU interacciona con la vía del ácido fólico y con la ruta metabólica de grupos metilo. La inhibición de la Timidilato Sintasa se produce mediante 5-

FU y 5,10-MTHF, que a su vez es el sustrato de MTHFR. Este proceso desemboca en una depleción en los niveles de folato circulante que conlleva desregulación del mecanismo de metilación celular al bloquear la síntesis de SAM, donador universal de grupos metilo (Paz et al., 2002).

En los tumores colorrectales de nuestra población, se llevó a cabo el análisis de los genes supresores de tumores mencionados anteriormente cuya metilación aberrante se asocia al supuesto fenotipo metilador (CIMP). No se hallaron diferencias significativas en el fenotipo metilador (CIMP) atendiendo a grupos de edad o sexo. Sin embargo, sí que resultó existir una asociación significativa entre los tumores CIMP positivos y la localización en colon proximal (p-value 0.0337 test chi-cuadrado).

Los tumores CIMP+ presentan distintas características clinicopatológicas y moleculares, tales como diagnóstico en edades más avanzadas, localización proximal, histología mucinosa, alta incidencia de mutaciones *BRAF*, inestabilidad de microsatélites, estabilidad cromosómica (LOH-) y baja tasa de mutación de *p53* (Weisenberg et al., 2006; Goel et al., 2007). Sin embargo, existen publicaciones contradictorias sobre la propia existencia y la validez pronóstica de CIMP. El concepto de CIMP suele asociarse básicamente al envejecimiento, aunque también se asocia con la metilación aberrante del promotor de *hMLH1* o la inestabilidad de microsatélites (Yamashita et al., 2003; Anacleto et al., 2005). Aun así, en la población muestral, prácticamente todos los tumores MSI positivos eran CIMP positivos y tenían alterado el sistema de reparación del ADN (MMR). Estos datos son coherentes con la bibliografía, donde se indica que habitualmente los tumores CIMP positivos suelen asociarse con respuesta clínica pobre (Ward, 2003; Samowitz, 2005).

La respuesta al tratamiento es, consecuentemente, debida a una combinación de muchos parámetros diferentes, ya sean genéticos, epigenéticos o clinicopatológicos. Consecuentemente, a la hora de predecir el tipo de respuesta, es recomendable realizar un análisis conjunto de todos ellos.

Otra revelación derivada del estudio es que los tumores CIMP+ también tendían a mostrar localización proximal. Por ello, al igual que los tumores proximales suelen ser más agresivos, los tumores CIMP positivos mostrarían mayor agresividad que el resto. Ambos efectos encajan perfectamente puesto que la metilación de genes supresores de tumores o de genes reparadores del ADN, lleva al silenciamiento de los mismos. Esta falta de expresión podría contribuir a la acusada agresividad, en términos patológicos, de los tumores localizados en el lado derecho. Este dato se asociaría con un pronóstico de la enfermedad definitivamente desfavorable.

Análogamente, en la población de estudio, los tumores de lateralidad izquierda o distales eran menos agresivos y se presentaban, en general, en estadios más tempranos. Además, estos tumores distales son generalmente CIMP negativos. Es decir, en estos pacientes será poco frecuente encontrar metilación aberrante de genes supresores de tumores. El

conjunto de ambos efectos, permitirá que dichos individuos respondan mejor al tratamiento y presenten una toxicidad menos acusada (Ward, 2003; Samowitz, 2005).

Concluimos entonces que los tumores localizados en el lado derecho del colon tienen un fenotipo más agresivo que los del lado izquierdo y además suelen ser CIMP positivos. Paralelamente, los tumores localizados en el lado izquierdo tienen mayoritariamente fenotipo metilador negativo y muestran menor agresividad.

La transcendencia de estos resultados puede adquirir mayor relevancia si los consideramos desde una perspectiva más pragmática, respecto a la repercusión predictiva o pronóstica de los marcadores de metilación. Los tumores de colon de localización derecha mostraron mayor agresividad y mayor número de promotores aberrantemente metilados. Los marcadores de metilación en general, y en particular los considerados para definir el fenotipo CIMP, son característicos de estos tumores, y presentan varios de ellos metilados. La señal de metilación es fácilmente detectable, puesto que la muestra de partida para el análisis es ADN (más estable que el ARN), menos variable que una cuantificación de expresión génica o proteica, y además se trata de una señal positiva sobre un fondo negativo, que corresponde al tejido normal (normalmente no metilado en esos promotores de genes supresores de tumores de manera somática). Estos factores, entre otros, convierten a los marcadores de metilación, especialmente a los característicos del posible fenotipo metilador, en elementos de gran relevancia y potencial para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de colon. Además, los tumores de colon liberan células de descamación tumorales que son arrastradas con las heces. Las técnicas de detección de metilación en genes supresores de tumores son muy sensibles y específicas, por lo que son apropiadas para detectar estas anomalías epigenéticas en muestras de fácil acceso, como las heces. De este modo, podemos concluir que las heces constituyen un material biológico de fácil acceso para detectar marcadores epigenéticos de gran valor diagnóstico, pronóstico e incluso predictivo del cáncer de colon y recto.

5.2.2.2. MGMT

A la vista de los resultados generales relacionados con el fenotipo metilador, hipotetizamos acerca de la existencia de alguna posible asociación entre los marcadores moleculares y el tipo de respuesta a terapia basada en 5-FU. *MGMT* es un gen de reparación del ADN que se encuentra frecuentemente inactivado por metilación en tumores colorrectales. Su función principal es eliminar acumulaciones mutagénicas y citotóxicas de O⁶-metil-guanina en el ADN (Pegg et al., 1990). Estos depósitos son el modo de acción de los agentes alquilantes quimioterapéuticos como la procarbina o la temozolamida.

Realizamos un estudio comparativo entre el estado de metilación aberrante del promotor del gen *MGMT* en la población de cáncer colorrectal y las distintas características del tumor. Observamos que los tumores distales eran los que tenían menor frecuencia de

metilación aberrante en *MGMT* ($p=0.0216$). Por el contrario, estudios recientes habían determinado que los tumores proximales manifestaban menor frecuencia de metilación en el promotor de *MGMT* que los tumores distales (Deng et al., 2008). Nuestra población de estudio no mostró una asociación significativa entre el estado metilado del promotor de *MGMT* y la inestabilidad de microsatélites. Atendiendo a la funcionalidad de *MGMT*, y puesto que es un gen de reparación del ADN, parecería más lógico suponer que estuviera inactivado por metilación aberrante en los tumores más agresivos, ya que la eliminación de los genes reparadores confiere una gran ventaja selectiva. En nuestro estudio, los tumores de colon proximal o derecho mostraban un fenotipo más agresivo que los del lado izquierdo y se asociaban con fenotipo MSI positivo. El estado de metilación de cada tumor está estrechamente ligado a las distintas características clínicas y moleculares que éste posee. Por ello, la prevalencia de MSI en colon proximal probablemente influyó los resultados de Deng y colaboradores. Es posible que la relación que encontraron entre MSI positivo y el promotor de *MGMT* metilado aberrantemente sea debida, en realidad, a la localización de los tumores MSI positivos, que eran, en su gran mayoría, proximales.

La hipermetilación aberrante de islas CpG presentes en los promotores de algunos genes como *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}* y *hMLH1*, se correlaciona con la pérdida de transcripción de *MGMT* (Herman J, et al. 1998; Esteller et al., 2001). La metilación simultánea de los promotores de *p16^{INK4a}* y *MGMT* tenía lugar en el 13% de los casos ($p=0.0033$). En otros estudios, esta metilación en ambos promotores aparece aproximadamente con la misma frecuencia y algunos lo asocian con una mayor supervivencia libre de enfermedad y menor presencia de metástasis, aunque depende del origen geográfico de los pacientes (Krtolica et al., 2007). En este estudio no se ha analizado aún la supervivencia a largo plazo, puesto que es un estudio en parte prospectivo. En el momento de conclusión de esta tesis no se produjo seguimiento a largo plazo de los pacientes, pero no se descarta continuar el seguimiento clínico en el futuro.

En nuestra población de estudio, existía una tendencia a responder peor al tratamiento en aquellos pacientes que tenían el promotor de *MGMT* hipermetilado. El silenciamiento de *MGMT* por metilación aberrante de su promotor, conferiría mayor agresividad al tumor. Sin embargo, existen datos publicados de pacientes con glioblastoma tratados con agentes alquilantes en los que la hipermetilación de la isla CpG que contiene al promotor de *MGMT* predice una buena respuesta a la quimioterapia (Esteller et al., 2000; Paz et al, 2003). Es importante destacar que la hipermetilación aberrante del promotor de *MGMT* por sí misma, sin tratamiento con agentes alquilantes, no es un buen factor pronóstico. De hecho, se asocia con mal pronóstico, probablemente porque se acumulan mutaciones en *p53* y *k-ras*. Este es un ejemplo de la diferencia entre marcadores pronósticos y predictivos. Los marcadores pronósticos hacen referencia a la progresión de la enfermedad independiente del tratamiento recibido. El marcador pronóstico incluye variables asociadas al tumor (como el estadio, diferenciación, lateralidad...) y al propio paciente o sus hábitos (edad, sexo, tabaquismo, alcohol, dieta...). Los marcadores predictivos predicen respuesta asociada a una terapia

específica. La metilación aberrante de *MGMT* es un marcador pronóstico negativo y un marcador predictivo positivo. Por tanto, puede ser determinante de la mejor estrategia quimioterapéutica para cada individuo, por lo que es un ejemplo práctico de farmacogenómica, o en este caso, farmacoepigenómica.

En resumen, el análisis de metilación de un panel de 11 genes indica que la metilación aberrante es un evento temprano y frecuente en carcinogénesis colorrectal. Además, nuestros datos apoyan la hipótesis de que la localización de los tumores colorrectales puede estar vinculada al patrón de metilación específico y a las características clínicas y moleculares de los mismos, y que esto, en último término, se asocie con el proceso tumorogénico o incluso con la respuesta al tratamiento de quimioterapia basado en 5FU.

5.2.3. Respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo/oxaliplatino según el perfil genético del tumor

El objetivo de muchas investigaciones farmacogenéticas consiste en identificar marcadores genéticos que predigan la toxicidad y eficacia de la droga. En el caso de agentes citotóxicos, tales marcadores predictivos se podrían usar para identificar aquellos pacientes que probablemente no responderán al tratamiento antes de la administración del mismo, así como determinar aquellos pacientes que tendrán grandes riesgos o toxicidad excesiva. Esta información consentiría establecer regímenes de quimioterapia individualizados, que permitan el correcto funcionamiento de la droga manteniendo la calidad de vida de aquellos pacientes en los que *a priori* sabemos que el tratamiento será efectivo. Para introducir este concepto en la práctica clínica rutinaria, se requieren marcadores predictivos de respuesta que, además de ser estables, robustos y reproducibles de acuerdo con los criterios de la FDA (*Food and Drug Administration*), causen una mínima inconveniencia al paciente. El análisis de polimorfismos es una prueba sencilla que puede realizarse a partir de una pequeña muestra de sangre (en el caso de que sean marcadores conservados en línea germinal y no específicos de tumor) o biopsia de tejido.

Las tasas de respuesta a quimioterapia basada en 5-FU administrada de manera adyuvante en pacientes de cáncer colorrectal, es aproximadamente 20-30%; aun así, sigue siendo la forma de tratamiento preferente. Se han hecho innumerables intentos por identificar marcadores predictivos para la respuesta a 5-FU, poniendo especial interés en las enzimas implicadas en su ruta metabólica, incluyendo *TYMS*, *TP* y *DPYD*, así como *p53* y el estado del sistema de reparación MMR (Leichman et al., 1997; Metzger et al., 1998; Salonga et al., 2000; Ahnen et al., 1998; Elsaleh et al., 2001). Mientras que unos estudios han demostrado eficacia predictiva para esos marcadores, otros han corroborado estas propuestas (Allegra et al., 2003; Johnston et al., 2003; Berglund et al., 2002). En este estudio, demostramos la capacidad de predecir la respuesta al tratamiento con 5-FU de estos genes, usando un panel

de 17 líneas celulares. Por otro lado, establecemos las diferentes asociaciones que existen entre los polimorfismos en *TYMS*, la expresión de *DPYD*, el estado de *p53*, MSI y MMR, y la respuesta y toxicidad producidas por el tratamiento en pacientes de cáncer colorrectal.

5.2.3.1. Efecto de los polimorfismos de la Timidilato Sintetasa en la respuesta y tolerancia a 5-Fluorouracilo en pacientes de cáncer colorrectal

Inicialmente, nos planteamos buscar posibles asociaciones entre la presencia de los polimorfismos de la Timidilato Sintasa y la respuesta a quimioterapia basada en 5-FU.

A lo largo de los años se han hecho innumerables estudios acerca de la influencia de los polimorfismos de *TYMS* en su expresión. En nuestra población de estudio, aquellos tumores portadores del alelo 3G (VNTR 3R y la variante SNP G) presentaban significativamente sobreexpresados los niveles de ARNm de *TYMS*. Con posterioridad, se demostró que los pacientes portadores de este alelo 3G y con niveles elevados de *TYMS* no respondían al tratamiento con 5-FU ($p=0.0001$).

No obstante, al separar la población de genotipo 3G según el estado de *p53*, resultó que, en realidad, la expresión de *TYMS* aumentaba principalmente en los tumores *p53* mutantes. Es decir, que el alelo 3G esencialmente conlleva sobreexpresión de la enzima cuando *p53* no es funcional. A partir de estos resultados, se puede confirmar que existe una clara relación determinada por el genotipo tumoral de *TYMS* y *p53*, la toxicidad y respuesta al tratamiento con 5-FU.

También descubrimos que existía una relación inversa significativa entre el alelo normal +6pb en el extremo 3'UTR del gen *TYMS* y la respuesta a 5-FU. Gran parte de los pacientes con el genotipo homocigoto silvestre +6pb/+6pb no respondían favorablemente a la terapia basada en 5-FU. Asimismo, los pacientes homocigotos normales +6pb/+6pb mostraron sobreexpresión significativa del ARNm de *TYMS*. Este hallazgo confirmaría que el alelo normal (+6pb) y el alelo con tres repeticiones (3R) dan lugar a una mayor cantidad de ARNm de *TYMS* tal y como se había propuesto anteriormente (Horie et al., 1995; Marcuello et al., 2004). Esta cierta tendencia a responder mal al tratamiento en pacientes homocigotos normales +6pb/+6pb, podría ser debida a la sobreexpresión de *TYMS*. Además, el exceso de enzima dificulta la inhibición de ésta por 5-FU a través de la formación del complejo ternario. Empero, según nuestra población de estudio, esto sólo ocurre cuando la proteína TP53 no es funcional.

Una posible explicación para este hallazgo sería que *p53* regula la expresión de *TYMS* al bloquear a los factores de transcripción que se unen a su promotor, como indicaron Chu y colaboradores previamente (Chu et al., 1998). De este modo, evita que se sobreexprese aunque contenga el SNP 3G o la inserción +6pb. Consecuentemente, cuando *p53* no es funcional, no puede inhibir la transcripción de la enzima. Por otro lado, parece que *TYMS* regula también la expresión de *p53* mediante la unión a su ARNm (Ju et al., 1999). Además,

p53 es un sensor de daño al ADN, por lo que su ausencia provoca que no tenga lugar el proceso de apoptosis ni la parada del ciclo celular. Por todo ello, los tumores *p53* mutantes frecuentemente no responderán a la terapia basada en 5-FU. Estos resultados se apoyan experimentos previos, en los que se demostró que se requería la funcionalidad de *p53* y *c-myc* para que las células tumorales fueran sensibles al tratamiento con 5-FU (Arango et al., 2001). Sería aconsejable, por tanto, comprobar el genotipo de *p53* y *TYMS* en tumores de colon antes de someter al paciente a dicho tratamiento. Por otro lado, existe un estudio muy reciente que indica que la proteína TP53 silvestre, en respuesta al daño al ADN, inhibe la transcripción de la dUTPasa, enzima que cataliza la hidrólisis de dUTP a dUMP, sustrato de TS. La depleción del reservorio de dUMP produce la inhibición de TS independientemente de *p53* (Wilson et al., 2009). Puede que ése sea el verdadero motivo por el que los pacientes con *p53* mutado parecen tener mayor expresión de *TYMS*, cuando en realidad son los pacientes *p53* normales los que tienen la expresión reducida. Claro que los niveles de expresión de *TYMS* medidos en nuestra población son de ARNm y no de proteína. Por lo que es indispensable cuantificar la expresión proteica de TS en las muestras tumorales.

Por otro lado, se vio que la sobreexpresión de TS en presencia del SNP 3G aumentaba de forma proporcional al número de copias de este alelo en los tumores *p53* mutantes (2R/3G < 3C/3G < 3G/3G), al igual que ocurría en líneas celulares, por lo que parecen confirmarse los resultados *in vitro*. Por tanto, hasta el momento, en la consideración de los distintos factores analizados como elementos de un algoritmo predictivo de respuesta, podríamos considerar como decisivos el fenotipo metilador, el estado de *p53* y el genotipo de *TYMS*.

Además, comprobamos que los pacientes homocigotos normales (+6pb/+6pb) en la región 3'UTR del gen *TYMS* tenían mayores cantidades de ARNm que los pacientes homocigotos para la delección (-6pb/-6pb), datos que coinciden con los publicados por Mandola y colaboradores con anterioridad (Mandola et al., 2004). Análogamente, otros investigadores han descubierto una fuerte asociación entre la presencia de los alelos 3G (VNTR 3R y SNP G) con una expresión de ARNm de entre 2-4 veces superior a los alelos 3C y 2R respectivamente (Horie et al., 1995; Marcuello et al., 2004). Nuevamente, estas proporciones sólo se cumplen en nuestra subpoblación con *p53* mutado. Algunos estudios han demostrado que el SNP 3G no afecta a la expresión génica de *TYMS*, sino a su eficiencia traduccional (Kawakami et al., 2001). El mecanismo por el que se vinculan los polimorfismos en esta región con los niveles de expresión de *TYMS* aún no está claro. Sin embargo, se ha demostrado que la primera copia de la repetición es necesaria para la formación de un *loop* de contención alrededor del inicio de traducción ATG y al menos una copia de la repetición es necesaria para que la transcripción tenga lugar (Kaneda., 1992; Marsh., 2005). Además, datos comprobados sugieren que hay un dominio de unión USF1 presente en las repeticiones, lo que conllevaría un incremento en la cantidad de estos lugares de unión USF1 al aumentar el número de repeticiones, y finalmente, un incremento de la transcripción del gen (Villafranca et al., 2001). Tal y como procedimos en los estudios *in vitro* con nuestro panel de líneas

celulares, seguramente aportaría una información valiosa el análisis del estado de metilación de las diferentes regiones ricas en CpG del promotor de *TYMS*, y la relación con los niveles de expresión. Por ello, no descartamos continuar con estos estudios.

Por consiguiente, se podría esperar que los polimorfismos en *TYMS*, a través de su influencia en el nivel de expresión de esta enzima, repercutieran sobre la respuesta clínica al tratamiento con 5-FU (Iacopetta et al., 2001). De hecho, en nuestra población de estudio encontramos que tanto los niveles elevados de ARNm de TS como los polimorfismos del promotor (3G) y del extremo 3'UTR (+6pb), se asociaban significativamente con una respuesta pobre a 5-FU. Es por esto que tanto los niveles de ARNm de *TYMS* como su genotipo, suponen un marcador predictivo de supervivencia específica a cáncer colorrectal en pacientes que reciben terapia adyuvante con 5-FU, como se había señalado anteriormente (Kornmann et al., 2003).

Es aconsejable medir además, los niveles proteicos. Aunque nuestros experimentos *in vitro* mostraban valores correlativos entre la cantidad de ARNm y proteína de *TYMS*, algunos autores han observado discordancias. Probablemente, aquellas diferencias eran debidas a una toma de muestra realizada en diferentes zonas del tejido tumoral, y la consecuencia era una falsa heterogeneidad (Johnston et al., 1995). Además, esta enzima está regulada por un ritmo circadiano (Wood et al., 2006), que también podría influir en el nivel de expresión.

Finalmente, se observó que los polimorfismos VNTR y SNP del promotor y 3'UTR del gen *TYMS* estaban en desequilibrio de ligamiento y el haplotipo 3R/+6pb se asociaba significativamente con una mala respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU. Es decir, la distribución de los dos polimorfismos no es al azar, sino que se encuentran con mayor frecuencia los alelos de tres repeticiones (3C y 3G) junto con el extremo 3'UTR no delecionado. Estos alelos son precisamente los que se asocian con mayor expresión de la enzima. El hecho de que aparezcan en desequilibrio de ligamiento implica una selección del fenotipo resistente. Ya se había señalado con anterioridad que el polimorfismo de la deleción de 6pb podía estar relacionado con aumento de sensibilidad a 5-FU mediante niveles de expresión reducidos de *TYMS* (Lecomte et al., 2004). Parece que el hallazgo de este desequilibrio de ligamiento confirmaría esta hipótesis. No obstante, estos datos difieren de los publicados por Nief y colaboradores, quienes realizaron un estudio en las líneas celulares del panel NCI-60 y publicaron que existía desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos 3R y deleción de 6pb, de forma que aparecían con mayor frecuencia los haplotipos 2R/+6pb y 3G/-6pb (Nief et al., 2007). Esta disparidad puede tener su origen en la pérdida de heterocigosidad que tiene lugar frecuentemente en el cromosoma 18p, donde se localiza el locus de TS, en tumores de colon. Puesto que las líneas celulares que utilizaron en aquel estudio eran de diversos tejidos tumorales, no es comparable con nuestra población de estudio, donde todos los tumores utilizados para este análisis son colorrectales.

Por consiguiente, la determinación del genotipo de *TYMS* antes del tratamiento puede ser útil para seleccionar si la combinación quimioterapéutica basada en 5-FU podría ser de

buen pronóstico para cada paciente de forma individualizada. Así, en el caso de pacientes con genotipo de resistencia, se podría optar por otro fármaco alternativo, como el CPT-11.

Los niveles de TS no sólo son predictivos para la respuesta a 5-FU, sino que también pueden ser un valor pronóstico de supervivencia en pacientes no tratados, posiblemente debido a que los bajos niveles de TS se corresponden con tipos tumorales menos agresivos o con menor crecimiento potencial (Baukelien et al., 2000). A la luz de los datos obtenidos, se concluyó que los pacientes con haplotipo 3C/3G, 3G/3G y 2R/3G tenían menor probabilidad de remisión del tumor después del tratamiento neoadyuvante con fluoropirimidinas, que aquellos con haplotipo 2R/2R, 2R/3C y 3C/3C. Además, quedó comprobado que los pacientes con al menos un alelo 3G en la enzima TS mostraban mayor grado de toxicidad al tratamiento. Por tanto, los niveles altos de TS se asocian con menor supervivencia libre de enfermedad, aunque debe ser comprobada tras un período de tiempo más largo.

En algún caso, al comparar el genotipo en línea germinal y tumor del mismo individuo, se observó que había tenido lugar una mutación de 3C a 3G. En realidad es un locus polimórfico que puede contener el SNP C o G, siendo G el alelo variante. En el caso de estos pacientes, las células somáticas y por tanto, del tejido normal, son de genotipo silvestre. Se produce una transversión en los tumores, que pasan a tener genotipo variante para los dos polimorfismos del promotor 3G mientras que el tejido normal sigue siendo 3C. Es decir, que los pacientes portadores del alelo 3C en línea germinal, tenían tumores portadores del alelo 3G. Recordemos que el alelo 3G se asocia con una expresión enzimática dos veces superior al 3C. A su vez, el alelo 3G está ligado a una mala respuesta a 5-FU. Esto se debe a que se produce sobreexpresión de la enzima TS, y, aunque el 5-FU la inhiba en parte, no puede inhibir todo el exceso existente. Por tanto, al administrar la terapia basada en 5-FU a estos pacientes, se actúa de manera más agresiva contra las células normales que contra las tumorales.

Este hecho novedoso es de gran relevancia y no ha sido descrito con anterioridad en otros estudios, posiblemente por no realizarse estudios paralelos tumor-tejido sano del mismo individuo. Además, este dato confirmaba que los tumores adquieren resistencia a la terapia en pacientes cuya línea germinal muestra un patrón genotípico asociado a sensibilidad en base a nuestros resultados. Por tanto, una vez obtenido el algoritmo diagnóstico, habría de aplicarse no sólo a las muestras de sangre o tejido normal, sino a biopsias tumorales, aunque también se podría detectar en el caso de existir células metastásicas en el torrente sanguíneo. Puesto que un porcentaje mínimo de pacientes aparentemente sensibles al tratamiento según el estudio de polimorfismos en tejido sano, puede presentar un tumor que haya revertido su genotipo en favor de uno resistente, la conveniencia de estudiar el genotipo en muestras del tumor es evidente en estos casos. Si bien, no en el caso opuesto de aquellos pacientes que muestren un genotipo de resistencia en línea germinal. Es destacable en este sentido que no se observó ningún caso en el que se produjese el hecho contrario, es decir, una

transversión de 3G a 3C en el tumor, lo que pone nuevamente de manifiesto la relevancia de la adquisición por el tumor de un genotipo asociado a resistencia al tratamiento con 5-FU

Es interesante anotar que existen variaciones étnicas en cuanto a la frecuencia del polimorfismo VNTR del promotor de *TYMS* (Villafranca et al., 2001). La frecuencia de homocigotos 3R/3R en caucásicos es de un 30-37%, mientras que en latinos es del 42%. Y en la población mediterránea la frecuencia de 3R/3R es ligeramente mayor que en pacientes latinos, siendo el porcentaje aproximadamente 42.5%. En nuestro estudio, el porcentaje de homocigotos 3R/3R era del 41%, lo que difiere bastante de la distribución en pacientes Japoneses, donde la frecuencia 3R/3R es de más de un 80%. Este hecho lleva a pensar que el origen racial puede influir en otros parámetros de estudiados. También podría existir cierta interacción con factores ambientales, o como hemos demostrado en este estudio, con la dieta. Para eliminar este sesgo, sería recomendable realizar un estudio con pacientes de diferentes etnias.

También es destacable que algunos pacientes que presentaban el alelo silvestre +6pb en heterocigosis, lo habían perdido en el tumor. Estos tumores pasaban de ser heterocigotos +6pb/-6pb a ser homocigotos para la delección. Este dato confirma aún con más fuerza que los tumores cambian constantemente en busca de la ventaja selectiva.

En definitiva, este detallado análisis demuestra que el genotipado exhaustivo del gen *TYMS* puede predecir de un modo más preciso la respuesta clínica a quimioterapia basada en 5FU/oxaliplatino a corto plazo. Es fundamental la caracterización de marcadores predictivos a corto plazo, puesto que actualmente la inmensa mayoría son a largo plazo, lo que supone un hándicap en el tratamiento de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad.

El valor añadido resultante de estos estudios es que además al final contemos con una población perfectamente caracterizada a nivel molecular, genético y epigenético, lo que supone un gran beneficio para investigaciones futuras. Nuestros datos serán confirmados con un estudio prospectivo durante los próximos dos años, donde se realizará un exhaustivo seguimiento periódico de cada paciente. No obstante, los resultados sugieren que los polimorfismos VNTR del promotor del gen *TYMS* pueden ser útiles como factores predictivos para determinar la probabilidad de remisión del tumor tras la quimioterapia neoadyuvante con 5-FU en pacientes con cáncer colorrectal.

5.2.3.2. Polimorfismos en genes de la ruta del folato y su efecto en el patrón de metilación normal en tumores colorrectales

La inhibición óptima de TS requiere concentraciones celulares elevadas de 5,10-MTHF. MTHFR juega un papel primordial en el metabolismo del folato, catalizando la reducción de 5,10-MTHF a 5-CH3FH4 (Frosst et al., 1995; Van der Wilt et al., 2005; Weisberg et al., 1998).

Puesto que algunas alozimas variantes tienen actividad enzimática reducida *in vitro* comparadas con la silvestre, se puede especular que los pacientes con dichas variantes alélicas tendrán niveles celulares elevados de 5,10-MTHF. Como consecuencia, podrían presentar sensibilidad incrementada a fluoropirimidinas, de manera que respondan mejor a quimioterapias basadas en ellas y probablemente tengan un gran riesgo de toxicidad comparados con los pacientes portadores de alelos silvestres (Frosst et al., 1995; Weisberg et al., 1998; Cohen et al., 2003; Etienne et al., 2004).

Son muy pocos los estudios que se han centrado en la posible importancia de los SNPs en el gen *MTHFR* como posibles marcadores predictivos de la respuesta clínica al tratamiento con fluoropirimidinas, y los datos publicados al respecto son bastante contradictorios (Cohen et al., 2003; Etienne et al., 2004; Jakobsen et al., 2005). En este estudio se ha determinado que los pacientes con la variante alélica 677T tienen mejor respuesta al tratamiento y presentan menos efectos adversos. Asumiendo los efectos funcionales del alelo 677T, la incrementada termolabilidad de MTHFR provoca que su actividad enzimática se vea reducida, de modo que se acumularía el sustrato 5,10-MTHF, que es el cofactor necesario para la formación del complejo ternario. Al mismo tiempo, este alelo se ha asociado con niveles bajos de folato y elevados de homocisteína en plasma (Terrazino et al., 2006), por lo que se trata de un hecho que ha de tenerse en cuenta a la hora de recomendar una dieta a pacientes tratados con 5-FU. La acumulación de homocisteína en plasma es altamente tóxica. El alelo 677T, al incidir sobre la funcionalidad de MTHFR, produce un decremento en la síntesis de folato circulante, producto de esta enzima. Por tanto, es beneficioso que los pacientes tratados con 5-FU tengan una dieta rica en folato, tal y como demostramos en este estudio de manera inversa, es decir, mediante el estudio previo del tipo de dieta de los pacientes y su asociación posterior con la respuesta y otros factores clinicopatológicos y genéticos de cada individuo.

El sustrato de MTHFR es utilizado como cofactor en la formación del complejo ternario (TS-5,10MTHF y 5-FU), por lo que ante un aumento de actividad de TS, la enzima MTHFR tiene reducido su reservorio de sustrato para la síntesis de folato. Por otro lado, ese aumento de homocisteína plasmática que se produce como consecuencia de la actividad enzimática reducida de MTHFR de la variante 677T, a pesar de ser cardiotóxica, no manifiesta efectos adversos en los pacientes. Esto pone de manifiesto que la función de la enzima MS, que sintetiza metionina a partir de homocisteína, es vital en esta encrucijada metabólica. Es importante tener en cuenta que, a pesar de que tanto 677T como 1298C producían una disminución en la actividad enzimática, este último por sí solo no aparecía asociado con niveles disminuidos de folato en plasma, y tampoco permitía predecir la respuesta a quimioterapia basada en 5-FU en nuestra población, lo que resulta coherente con los datos publicados en la bibliografía (Narayanan et al., 2004; Friedman et al., 1999).

A nivel epigenético, los pacientes portadores del alelo mutante *MTHFR* 1298C o 677T, presentaban cantidades menores de 5-mC en tejidos normales que los homocigotos silvestres.

Dado que ambos polimorfismos provocan una reducción funcional de la enzima MTHFR y, en último término, una depleción de los niveles de SAM, donador universal de grupos metilo, es previsible que se produzca hipometilación global del genoma (Trinh et al., 2002; Lucock et al., 2000; Paz et al., 2002). En líneas celulares no se encontró esta asociación, puesto que el medio de cultivo es rico en folato y precursores SAM, y cualquier deficiencia enzimática queda solapada por el exceso de micronutrientes y precursores en el medio de cultivo

Los análisis de toxicidad nos sorprendieron en pacientes homocigotos normales *MTHFR* 677CC, que presentaban gran cantidad de efectos adversos tras el tratamiento con 5-FU. Si bien estos datos apoyan la hipótesis de que la variante alélica 677T reduce la incorporación errónea de uracilo al ADN, ya que la acumulación del sustrato de MTHFR facilita la conversión de dUMP en dTMP para la síntesis de timidina a través de TS (Figura 8). Esta afirmación se encuentra reforzada por la gran tolerancia al tratamiento que mostraron los pacientes dobles mutantes 677TT, donde la incorporación errónea de dUTP al ADN es aún menos probable.

A lo largo de los años se han intentado caracterizar los tumores de colon en función del genotipo que presentan. En este estudio existía una fuerte asociación entre la localización distal del tumor y la presencia del alelo silvestre *MTHFR*-677C. Anteriormente, se demostró que la lateralidad distal estaba ligada a estadios poco avanzados de la enfermedad. Es posible que exista una presión evolutiva en la que se ha ido seleccionando el alelo mutante 677T en los tumores más agresivos, es decir, los de colon derecho. Para ratificar este dato, existen estudios en los que se ha asociado el genotipo doble mutante 677TT con estadios avanzados en cáncer de colon derecho (Le Marchand L et al., 2005). Por tanto, independientemente de la respuesta posterior a la quimioterapia, los pacientes con genotipo 677CT/CC son menos susceptibles de desarrollar tumores agresivos.

El análisis sistemático de estos resultados en conjunto nos proporciona la base para sugerir un nuevo factor a considerar en la configuración de un algoritmo predictivo de respuesta al tratamiento con esquemas de quimioterapia basados en 5-FU. Este elemento implicaría el análisis de los polimorfismos del gen *MTHFR*, por la asociación estadísticamente significativa del alelo 677T con la toxicidad y respuesta al tratamiento. Además, podría ser considerado un factor pronóstico de gran valor clínico, de forma paralela.

La Metionina Sintasa (MS) es la enzima que lleva a cabo la remetilación de homocisteína a metionina tomando el grupo metilo del folato circulante (5-MTHF). La metionina es el precursor de SAM, donador universal de grupos metilo, fundamental en la regulación del mecanismo de metilación del ADN. El polimorfismo estudiado en el gen *MS* produce una reducción en la actividad enzimática (Leclerc, 1996).

En los tumores de colon distal de la población muestral, sólo se encontró una copia del alelo variante de *MS*. La Metionina se biosintetiza con folato, por lo que la enzima MS resulta, una vez más, clave para la determinación de los niveles en plasma. De manera que una sola

copia mutada supone, en realidad, una acumulación de sustrato, el folato circulante que resultaría favorable en el tratamiento con 5-FU.

5.2.3.3. Inestabilidad de Microsatélites (MSI)

Los Microsatélites son loci polimórficos presentes en el ADN que consisten en repeticiones de secuencias de 1 a 6 nucleótidos que se ubican uno tras otro. Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN. Son neutros, co-dominantes y poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos. A pesar de esto, la variabilidad que presentan resulta de gran utilidad para su uso como marcadores moleculares. La inestabilidad de microsatélites (MSI) se define como un alelo de nueva longitud (en la región denominada microsatélite) dentro del tumor que no existe en el tejido normal, y se considera un biomarcador de deficiencia en el sistema de reparación del ADN, MMR (*mismatch repair*). La pérdida de funcionalidad del sistema MMR ocurre en un 15% de los cánceres colorrectales esporádicos. Esta disfuncionalidad suele estar causada por la ausencia de expresión o déficit funcional de *hMLH1*. Este silenciamiento suele estar causado por mutación y, en ocasiones, cuando no está mutado pero no se expresa, por hipermetilación aberrante su promotor. A pesar de la terapia adyuvante con 5-FU tras la resección quirúrgica del tumor, algunos pacientes con estadios avanzados de cáncer colorrectal desarrollan recurrencia. En nuestro estudio, investigamos si el estado de metilación aberrante del promotor de *hMLH1* es un factor pronóstico de respuesta a 5-FU. Para ello, se analizó la respuesta de los pacientes que presentaban el promotor de *hMLH1* hipermetilado, y no se encontró una asociación significativa entre ambos parámetros. Sin embargo, al establecer una relación entre el estado de metilación de dicho promotor y la inestabilidad de microsatélites (MSI), resultó que los tumores que no tenían metilado el promotor de *hMLH1*, tampoco presentaban MSI y el sistema de reparación MMR funcionaba correctamente. Puesto que en otros estudios se había relacionado directamente la hipermetilación aberrante del promotor de *hMLH1* con un mal pronóstico de la enfermedad (Ide et al., 2008), podríamos argumentar que debe de existir algún otro mecanismo derivado de la metilación de este promotor que cause un decremento en la expresión del ARNm, que es lo que desencadena la inestabilidad de microsatélites. Por tanto, sería de gran interés analizar la expresión de ARNm de *hMLH1* mediante RT-PCR cuantitativa para determinar si se asocia con el tipo de respuesta al tratamiento. Aun así, ya se postulaba que el estadio del tumor puede influir en estos resultados, por lo que los tumores en estadios C-D de Dukes tendrían peor pronóstico. Tampoco hay que olvidar que la frecuencia de metilación aumenta gradualmente con la edad del individuo, y que este parámetro también influiría en el pronóstico.

5.2.3.4. Patrones de metilación en cáncer de colon

La hipermetilación del ADN en promotores ricos en CpG se reconoce como una característica común de los tumores humanos. Los tipos de cáncer pueden ser clasificados de acuerdo a su grado de metilación, y aquellos con alto grado (CIMP positivos), representan un grupo clínico y etiológicamente distinto (Toyota et al., 1999).

En nuestra población de estudio, aproximadamente el 30% de los cánceres colorrectales mostraban hipermetilación concurrente de múltiples islas CpG, referido a islas CpG determinantes del fenotipo metilador (CIMP). Estos datos son coherentes con los encontrados en la bibliografía (Rashid et al., 2004).

Algunos investigadores postulan que las deficiencias en los sistemas de reparación MMR producen un fuerte fenotipo mutador e incrementan la frecuencia de MSI, mientras que otros piensan que MSI es consecuencia de CIMP (Goel et al., 2007; Yamasita et al., 2003; Anacleto et al., 2005). Los tumores esporádicos con alto MSI se asocian con la hipermetilación del promotor de *hMLH1*. Paralelamente, la hipermetilación aberrante de islas CpG localizadas dentro de regiones promotoras se ha asociado con silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores tales como *p16^{ink4a}* y *hMLH1*. Además, se ha propuesto que juegan un papel muy importante en el desarrollo del cáncer, este mecanismo de inactivación génica podría ser también relevante para la respuesta de células tumorales a 5-FU. Los genes requeridos para la supervivencia celular en presencia de agentes citotóxicos como el 5-FU o el oxaliplatino, se podrían reprimir mediante hipermetilación, haciendo de ésta un potencial factor predictivo de gran trascendencia.

En apoyo a esta teoría, los pacientes de cáncer colorrectal cuyos tumores primarios muestran metilación frecuente de promotores, obtienen un beneficio de supervivencia del 5-FU, no así aquellos cuya metilación es infrecuente o nula (Van Rijnsoever et al., 2003).

En el presente estudio, la frecuencia de hipermetilación del promotor de *MGMT* fue inferior a la esperada, presumiblemente por tratarse de una población joven, y no se asociaba significativamente con la respuesta al tratamiento. Otros estudios habían demostrado que los pacientes tratados con 5-FU oral que tenían *MGMT* metilado, mostraban una excelente supervivencia libre de enfermedad comparados con los que lo tenían desmetilado (Nagasaka et al., 2003). La hipermetilación del promotor de *MGMT* se asocia con mutaciones en el gen *k-ras*, por lo que sería interesante realizar un análisis del estado de este gen en los individuos y ver si se distribuye en rangos de edad. Existe constancia de que, en el caso de los tumores colorrectales, la metilación aberrante del promotor de *MGMT* no confiere sensibilidad a la acción de agentes alquilantes si el tumor es MMR deficiente. Este fenómeno ocurre en un 10% de los tumores de colon y en este caso, la presencia de silenciamiento simultáneo de *hMLH1* y *MGMT* por metilación confiere resistencia a la muerte celular y puede incrementar la tasa de mutación de esa neoplasia (H. Kawate, et al., 1998).

A la vista de los resultados para los perfiles de metilación en tumores colorrectales, parece que los genes escogidos como propios del fenotipo metilador son bastante adecuados. Parece, por tanto, que el patrón de metilación aberrante de estos genes junto con la inestabilidad de microsatélites, tiene un gran valor predictivo para respuesta a 5-FU y pronóstico en la evolución de la enfermedad. También puede ser pronóstico de predisposición a padecer cáncer colorrectal hereditario en los casos de tipo familiar.

Finalmente, el producto del gen supresor de tumores $p14^{ARF}$ activa y estabiliza TP53 por interacción directa con $MDM2$, causando la parada del ciclo celular (Sherr et al., 1998). No obstante, se ha comprobado que la hipermetilación del promotor de $p14^{ARF}$ es un proceso relativamente común en la carcinogénesis, y no está necesariamente asociado con el estado de metilación de $p16^{INK4a}$ ni con el estado de $p53$, de acuerdo con Herman y colaboradores (1996), lo que resulta reseñable en el caso de $p16^{INK4a}$, dada la proximidad de ambos genes. Se han encontrado tipos tumorales, como linfomas de células B, donde aparece el promotor de $p16^{INK4a}$ hipermetilado y en cambio la isla del promotor de $p14^{ARF}$ nunca se encuentra metilada (Baur et al., 1999). Esas observaciones sugieren que la metilación *de novo* durante la tumorigénesis es un proceso independiente y probablemente controlado por mecanismos específicos de secuencia. Según algunos autores, la hipermetilación simultánea de ambos promotores se asocia con tumores en colon derecho, aludiendo que podría estar relacionada con la localización del tumor (Toyota et al., 1999). En este estudio no hemos encontrado tal asociación. Por otro lado, en nuestra población parece existir cierta tendencia de los tumores con el promotor de $p14^{ARF}$ metilado a presentar estadíos avanzados de Duke. En la bibliografía $p14^{ARF}$ aparece metilado preferentemente en carcinomas bien diferenciados, por lo que podría definir un subgrupo biológicamente distinto con rutas tumorigénicas diferentes. En cuanto a $p53$, existen hipótesis de unión de la proteína TP53 a la isla CpG del promotor de $p14^{ARF}$ por secuencias consenso con Sp1, lo que anularía el efecto protector de éste contra la metilación *de novo* del promotor de $p14^{ARF}$ favoreciendo su silenciamiento (Brandeis et al., 1994; Macleod et al., 1994).

En definitiva, este análisis exhaustivo del perfil genómico, epigenómico y clinicopatológico de los tumores de colon, combina diferentes parámetros tanto predictivos como pronósticos de respuesta a 5-FU y evolución de la enfermedad. El objetivo principal de este estudio consistía en la elaboración de un algoritmo molecular pronóstico que pudiera ser utilizado en la práctica clínica. Los tumores de colon presentan gran heterogeneidad, tanto a nivel clinicopatológico como a nivel molecular. Por ende, es importante resaltar que no es posible llevar a cabo un buen pronóstico sin tener en cuenta cada uno de los aspectos evaluados en esta tesis. Además, la complejidad de la ruta metabólica del 5-Fluorouracilo, así como la situación individual de cada paciente, conlleva la necesidad de estudiar los genes implicados en el metabolismo de grupos metilo, así como de la síntesis del ADN y del ácido fólico.

Como se ha descrito a lo largo de cuarenta años, el fallo de la terapia basada en 5-Fluorouracilo tiene múltiples orígenes. Asimismo, la respuesta a la droga es distinta en cada individuo e incluso entre el tejido tumoral y la línea germinal de un mismo individuo. Por tanto, la farmacogenómica toma la responsabilidad de dirigir la terapia a cada paciente de forma individualizada. Las técnicas actuales permiten llevar a cabo una evaluación global del paciente de una forma rápida y eficaz, por lo que cada vez nos encontramos más cerca de proponer el tratamiento óptimo desde el momento en que se detecta la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

1. Es posible definir un algoritmo predictivo de sensibilidad al tratamiento tumoral con esquemas terapéuticos basados en 5-FU. Esta firma molecular se alcanza a través factores de diversa naturaleza y tiene carácter orientativo. Aun así, debido a la complejidad de los mecanismos de resistencia a la droga, tanto intrínsecos como adquiridos en células o tumores, es una labor complicada. Además, existen numerosos marcadores de resistencia que varían en cada individuo e incluso existe variabilidad en los marcadores de tejido tumoral y línea germinal, por lo que se requiere un estudio en mayor profundidad. Por consiguiente, se requiere la consolidación y validación en un mayor tamaño muestral de la sensibilidad y especificidad de este algoritmo predictivo
2. Las características moleculares, genéticas y epigenéticas de un tumor en un determinado individuo, así como sus hábitos, junto con las características clínicopatológicas del propio tumor, pueden complementar el diagnóstico además de ser componentes predictivos de una firma molecular de sensibilidad al tratamiento de quimioterapia. De este modo, los componentes de este algoritmo predictivo también tienen valor diagnóstico y pronóstico.
3. El genotipado exhaustivo del gen *TYMS* puede predecir con precisión la respuesta clínica a quimioterapia basada en 5FU/oxaliplatino a corto plazo. Los pacientes con genotipo 3C/3G, 3G/3G y 2R/3G presentan menor probabilidad de remisión del tumor después del tratamiento neoadyuvante con fluoropirimidinas que aquellos con genotipo 2R/2R, 2R/3C y 3C/3C. Además, aquellos pacientes portadores de al menos un alelo 3G muestran baja tolerancia al tratamiento. Por otro lado, el polimorfismo en 3'UTR +6pb se asocia con un fenotipo de resistencia a terapia con 5-FU y el haplotipo 3R/+6pb se asocia significativamente con una respuesta pobre. En general, la presencia del alelo 3G, a través del aumento de expresión de la enzima TS, se asocia con una mala respuesta a la terapia.
4. La expresión de TS está regulada a nivel transcripcional por *p53*. TP53 se une a los factores de transcripción de *TYMS* y bloquea su expresión. Por tanto, aquellos tumores con *p53* mutante no responderán a la terapia basada en 5-Fluorouracilo.
5. El fenotipo metilador CIMP y la inestabilidad de microsatélites, suponen suponen buenos marcadores independientes de pronóstico de cáncer colorrectal y predictivos de la terapia basada en 5FU/Oxaliplatino. El tratamiento combinado de 5-FU con agentes desmetilantes como 5-aza,

podrían mejorar la respuesta en pacientes mayores de 45 años, en los que el fenotipo metilador es significativamente más abundante.

6. Los pacientes portadores del alelo mutante 677T de MTHFR, tienen mejor respuesta al tratamiento y presentan menos efectos adversos. Sin embargo, esta variante se asocia con una acumulación de homocisteína tóxica en sangre y menor cantidad de folato circulante que los homocigotos silvestres. No obstante, parece que la relación inversa entre el alelo 677T y el cáncer de colon por acumulación de folato se limita a estadios avanzados de la enfermedad
7. Las células en fase S responden mejor al tratamiento con 5-FU. Por tanto, la combinación de éste con fármacos que favorecen la parada del ciclo celular en fase S, como el oxaliplatino, mejoran la respuesta a la terapia basada en 5-FU.
8. La dieta rica en folato se asocia con una mejor respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo y con estadíos más tempranos de la enfermedad. Por tanto, la ingesta o suplemento dietético de folatos es beneficiosa para aquellos pacientes tratados con esquemas de quimioterapia basados en dicho agente.
9. Los tumores de colon izquierdo tienen mejor pronóstico que los que se localizan en el lado derecho del colon. Presentan con mayor frecuencia el alelo silvestre 677C de la enzima MTHFR, lo que permite el correcto funcionamiento de la ruta metabólica del grupo metilo. Estos tumores no presentan hipometilación global ni acumulación de homocisteína tóxica. No obstante, responden peor a la terapia basada en 5-FU.
10. Los marcadores moleculares descritos con potencial predictivo a terapia basada en 5-FU para nuestra firma molecular de sensibilidad, pueden ser determinados en su mayoría en sangre periférica. De este modo, se evita un trastorno mayor al paciente y facilita su transferencia a la rutina clínica como determinante de sensibilidad. En el caso de ser detectado en sangre alguno de los polimorfismos o marcadores asociados a resistencia al tratamiento con 5-FU, se debería desaconsejar este último y buscar alternativas. En el caso de ser detectados marcadores asociados a sensibilidad a 5-FU en línea germinal, no podría descartarse la resistencia adquirida por el tumor durante la progresión, por lo que sería recomendable analizar el total de los marcadores moleculares, genéticos y epigenéticos en el tejido tumoral.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abad A. Capítulo 29: Cáncer de colon y recto. En: Manual de Oncología Clínica y Molecular. Ed. Arán, 2000

Alves G, Tatro A, Fanning T. Differential methylation of human line-1 retrotransposons in malignant cells. *Gene* 1996; 176: 39-44.

Ahen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA, Stemmerman G, Wells JD, Macdonald JS, and Meyskens. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behaviour of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res.* 1998; 58: 1149-58.

Alexander J, Watanabe T, Wu TT, et al. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001;158: 527-35.

Allegra CJ, Paik S, Colangelo L, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnston P, Wolmarck N, Wieand S. Prognostic Value of Thymidylate Synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: A National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *Journal of Clin Onc*, 2003 Jan; 21 (2): 241-50.

Allegra CJ, J. Jessup M, Somerfield MR., Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, and Schilsky RL American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: Testing for KRAS Gene Mutations in Patients with Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy (ASCO 2008).

An C, Choi IS, Yao JC, et al. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11: 656-63.

Anacleto C, Leopoldino AM, Rossi B, et al. Colorectal cancer methylator phenotype: fact or artifact? *Neoplasia* 2005;7:331-5

Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*. 1990 Aug 10; 62 (3): 503-14.

Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15;90(24):11995-9.

Arango D, Corner G A, Wadler , Catalano PJ, and Augenlicht LH. c-myc/p53 Interaction Determines Sensitivity of Human Colon Carcinoma Cells to 5-Fluorouracil in Vitro and in Vivo. *Cancer Research* 2001; 61, 4910-15.

Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, Kaneda S, Takeishi K, Seno T. Cell-cycle-directed regulation of thymidylate synthase messenger RNA in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate. *J Mol Biol* 1986;190: 559-567.

Baker K, Raut P, Jass JR. Microsatellite unstable colorectal cancer cell lines with truncating TGFbetaRII mutations remain sensitive to endogenous TGFbeta. *J Pathol* 2007;213:257-65.

Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphism in solid cancers. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30:593-601.

Banerjee D, Schneiders B, Fu JC, Adhikari D, Zhao SC, Bertino JR. Role of E2F in chemosensitivity . *Cancer Research* 1998; 58: 4292-6.

Banerjee D, Gorlick R, Liefshitz A, Danenberg K, Danenberg PC, Danenberg PV, Klimstra D, Jhanwar S, Cordon-Cardo C, Fong Y, Kemeny N, Bertino JR. Levels of E2F-1 expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2365-7.

Baukelien van Triest, Herbert M. Pinedo, Johannes L. G. Blaauwgeers, Paul J. van Diest, Pascale S. Schoenmakers, Daphne A. Voorn, Kees Smid, Klaas Hoekman, Henk F. W. Hoitsma, and Godefridus J. Peter Prognostic Role of Thymidylate Synthase, Thymidine Phosphorylase/Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor, and Proliferation Markers in Colorectal Cancer Clin Can Res. March 2000 Vol. 6, 1063–1072.

Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bosman FT, and Chaubert P. Frequent silencing of p15INK4b(MTS2) and p16INK4a(MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. Blood 1999; 94: 1773–1781.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. Hum Mol Genet. 2001 Apr;10(7):687–92. Review.

Beck A, Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Rene N and Milano G. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. Eur. J. Cancer, 1994, 30: 1517–22.

Bedikian AY, Kantarjian H, Nelson RS, et al. Colorectal cancer in young adults. South Med J 1981; 74:920–924

Behbehani A, Sakwa M, Ehrlichman R, Maguire P, Friedman S, Steele D Jr and Wilson RE. Colorectal Carcinoma in Patients under Age 40. Ann Surg. 1985; 202(5):610–614

Belvedere O, Puglisi F, Di Loreto C, Cataldi P, Guglielmi A, Aschele C and Sobrero A. Lack of correlation between immunohistochemical expression of E2F-1, thymidylate synthase expression and clinical response to 5-fluorouracil in advanced colorectal cancer Annals of Oncology 2004; 15: 55–58.

Benatti P, Gafa R, Barana D, et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. Clin Cancer Res 2005;11:8332–40.

Bendardaf R, Lamlum H, Ristamaki R, et al. Mismatch repair status is a predictive factor of tumour response to 5-fluorouracil and irinotecan chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. Tumour Biol 2007;28:212–20.

Berger, S. H., Chung-Her. J., Johnson, L. F., and Berger. F. G. Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells. Mol. Pharmacol., 28: 461–467, 1987.

Berger SH, Barbour KW, Berger FG. A naturally occurring variation in thymidylate synthase structure is associated with a reduced response to 5-fluoro-2'-deoxyuridine in a human colon tumor cell line. Mol Pharmacol 1988;34:480–484.

Berglund A, Edler D, Molin D, Nordlinder H, Graf W, and Glimelius B. Thymidylate synthase and p53 expression in primary tumor do not predict chemotherapy outcome in metastatic colorectal carcinoma. Anticancer Res. 2002; 22:3653–59.

Bestor TH, Tycko B. Creation of genomic methylation patterns. Nat. Genet. 1996; 12: 363–7.

Bestor TH. Transposons reanimated in mice. Cell 2005, 122: 322–5.

Bird A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature 1986; 321:209–13.

Bird A. The essentials of DNA methylation, Cell 1992; 70:5–8.

- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16:6-21.
- Bissoon-Haqqani S, Moyana T, Jonker D, Maroun JA, Birnboim HC. Nuclear expression of thymidylate synthase in colorectal cancer cell lines and clinical samples. *J Histochem Cytochem*. 2006 Jan;54(1):19-29. Epub 2005 Jun 13.
- Bodey B. Cancer-testis antigens: promising targets for antigen directed antineoplastic immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 2002; 2:577-84.
- Bodgen AE, Kelton DE, Cobb WR, Esber HJ. A rapid screening method of testing chemotherapeutic agent TYMS against Human Tumor Xenografts: symposium on the Use of Athymic Mice in Cancer Research. New York: Gustav Fisher, 1978
- Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*. 1994 Sep 29;371(6496):435-8.
- Breivik J, Lothe RA, Meling GI, Rognum TO, Borresen-Dale AL, Gaudernack G. Different genetic pathways to proximal and distal colorectal cancer influenced by sex-related factors. *Int J Cancer* 1997; 74:664-9.
- Brueckl WM, Moesch C, Brabletz T, et al: Relationship between microsatellite instability, response and survival in palliative patients with colorectal cancer undergoing first-line chemotherapy. *Anticancer Res* 23:1773-1777, 2003
- Bunn P, Niyikiza C, Rusthoven JJ, et al. Vitamin B12 and folate reduce toxicity of Alimta (pemetrexed disodium, LY231514, MTA), a novel antifolate/antimetabolite. San Francisco: American Society of Clinical Oncology; 2001.
- Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999, 104:263-269.
- Burri N, Shaw P, Bouzourene H, Sordat I, Sordat B, Gillet M, Schorderet D, Bosman FT, and Chaubert P. Methylation Silencing and Mutations of the p14 ARF and p16 INK4a Genes in Colon Cancer. *Laboratory Investigation* 2001. Vol. 81, No. 2, p. 217.
- Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, Cabrera BL, Goel A, Arnold CA, Miyai K, Boland CR. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2004;126(2):394-401
- Chang SC, Lin PC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AF. Role of MTHFR polymorphisms and folate levels in different phenotypes of sporadic colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22(5):483-9. Epub 2006 Aug 29.
- Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Spiegelman D, Willett WC, Hunter DJ. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1996 Nov 1;56(21):4862-4.
- Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, PAi A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet*. 2001 Mar 1;10(5):433-43.
- Chin KV, Ueda K, Pastan I and Gottesman M. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 1992; 255: 459-62.

Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y, Takizawa T, Koike M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Miyaki M. Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 4595-4597.

Chu, E., Zinn, S., Boorman, D., and Allegra, C. J. The interaction of 7- interferon and 5-fluorouracil in the H630 human colon carcinoma cell line. *Cancer Res.*, 50: 5834-5840, 1990.

Chu, E., Takechi, T., Jones, K. L., Voeller, D. M., Copur, S. M., Maley, G. F., Maley, F., Segal, S. & Allegra C. J. Thymidylate synthase binds to c-myc RNA in human colon cancer cells and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15, 179-185.

Chu E, Copur SM, Chen TM, Khleif S, Voeller DM, Mizunuma N, Patel M, Maley GF, Maley F and Allegra CJ. Thymidylate synthase protein and p53 mRNA form an in vivo ribonucleoprotein complex. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1582-1594

Clark, J. L., Berger. S. L., Mittelman. A., and Berger. F. G. Thymidylate synthase gene amplification in a colon tumor resistant to fluoropyrimidine chemotherapy. *Cancer Treat. Rep.* 71: 261-265. 1987.

Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, Morin I, Batist G, Rozen R. Methylene tetrahydrofolate Reductase Polymorphism in Advanced Colorectal Cancer: A Novel Genomic Predictor of Clinical Response to Fluoropyrimidine-based Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, May 2003. Vol 9, 1611-15.

Compton CC. Optimal pathologic staging: defining stage II disease. *Clin Cancer Res* 2007; 13:6862s-70s.

Costelo JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genet.* 2000 Feb; 24(2):132-8.

Crawford DC, Akey DT, Nickerson DA. The patterns of natural variation in human genes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2005, 6, 287-312.

Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu. Rev. Med.* 2005-b, 56:303-320.

Curtin NJ, Harris AL, Aherne GW: Mechanism of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2'-doxyuridine-5'-triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. *Can Res* 1991, 51: 2346-52.

Cusack Jr. J.C., Liu R., Houston M., Abendroth K., Elliott P.J., Adams J., Baldwin Jr. A.S., Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor- kappaB inhibition, *Cancer Res.* 2001; 61 : 3535-40

Danenberg PV. Thymidilate synthetase- a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta.* 1977 Dec 23;473(2):73-92.

Das K.C., White C.W., Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C, *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 14914- 20.

DeGregori J, Leone G, Ohtani K, Miron A, Nevins JR. E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev.* 1995 Dec 1;9(23):2873-87.

Demokan S, Demir D, Suoglu Y, Kiyak E, Akar U, Dalay N. Polymorphisms of the XRCC1 DNA Repair Gene in Head and Neck Cancer. *Pathology Oncology Res.* 2005; 11:22-25.

Deng G, Kakar S, Tanaka H, Matsuzaki K, Miura S, Sleisenger MH, Kim YS. Proximal and distal colorectal cancers show distinct gene-specific methylation profiles and clinical and molecular characteristics. *Eur J Cancer* 2008; 44:1290-301

Diasio RB and Johnston MR. Dihydropyrimidine Dehydrogenase: Its role in 5-Fluorouracil Clinical Toxicity and Tumor Resistance. *Clin Can Res.* 1999, 5: 2672-73.

Diasio RB, Johnson MR. The role of pharmacogenetics and pharmacogenomics in cancer chemotherapy with 5FU. *Pharmacology*, 2000. 61:199-203.

Doerfler W, DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem*, 1983; 52: 93-124.

Ehrlich M. DNA hypomethylation and cancer. In *DNA alterations in cancer genetic and epigenetic changes*. Eaton Publishing. Westborough MA, 2000; 273-91.

Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Griew F, Grant R, Joseph D, and Iacopetta B. p53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7:1343-49.

Esteller M, Garcia A, Martinez-Palones JM, Xercavins J, Reventos J. Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1⁹1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 1997 Dec; 18(12):2307-11.

Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH and Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res.* 1998; 58(20):1767-72.

Esteller M, Catasus L, Maatias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB and Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene*, 1998; 17:2413-14.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanclocha V, Baylin SB and Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med*, 2000; 343: 1350-54.

Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of p14 (ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000 Jan 1;60(1):129-33.

Esteller M, Fraga MF, Guo M, García-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, Trojan J, Vaur-Barrière C, Bignon YJ, Ramus S, Benitez J, Caldes T, Akiyama Y, Yuasa Y, Launonen V, Canal MJ, Rodríguez R, Capella C, Peinado MA, Borg A, Aaltonen LA, Ponder BA, Baylin SB and Herman JG. ADN methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Human Molecular Genetics*, 2001; 10: 3001-7.

Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002 Jan;196(1):1-7. Review.

Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-59. Review.

Etienne MC, Chéradame S, Fischel JL, Formento P, Dassonville O, Renée N, Schneider M, Thyss A, Demard F, Milano G. Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the role of intratumoral DPD activity. *J. Clin. Oncol.* 1995. 13: 1663-1670.

Etienne MC, Formento JL, Chazal M, et al., Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14:785-92.

Ezzo JA, Sullivan J, Mack RE. Carcinoma of the colon under the age of 40. *Ann Int Med* 1958. 49(2): 321-25.)

Falcone A, Pfanner E, Brunetti I, Allegrini G, Lencioni M, Galli C, Masi G, Danesi R, Antonuzzo A, Del Tacca M, Conte PF. Suramin in combination with 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (LV) in metastatic colorectal cancer patients resistant to 5-FU+LV-based chemotherapy. *Tumori* 1998; 84:666-668.

Feinberg A, Vogelstein b. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 1983; 301: 89-92.

Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol.* 2002 Oct;12(5):389-98. Review.

Fowler BM, Giuliano AR, Piyathilake C, Nour M, Hatch K. Hypomethylation in cervical tissue: is there a correlation with folate status? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Oct;7(10):901-6.

Fraga MF, Rodriguez R, Canal MJ. Rapid quantification of ADN methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis.*, 2000 Aug; 21 (14): 2990-4.

Freeny PC, Marks WM, Ryan JA, Bolen JW. Colorectal carcinoma evaluation with CT: preoperative staging and detection of postoperative recurrence. *Radiology.* 1986 Feb;158(2):347-53.

Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y et al., A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr* 1999. 129: 1656-61.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al., A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995, 10:111-113.

Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WK, et al. Overexpression of E2F1 in glioma triggers apoptosis and suppresses tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Nat Med* 1998; 4. 685-90.

Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, et al. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 2000;89:2025-37.

Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo Kc, Gehrke CW, Erlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic. Acids Es*, 1983;11:6883-94.

Gerritsen M.E., Carley W.W., Ranges G.E., Shen C.P., Phan S.A., Ligon G.F., Perry C.A, Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression, *Am. J. Pathol* 1995; 147: 278-92.

Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, et al. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007;132:127-38

Goldie JH, Coldman JJ. A mathematical model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 1979, 63: 1727-33.

Gorgoulis VG, Zacharatos P, Mariatos G, Kotsinas A, Bouda M, Kletsas D, Asimacopoulos PJ, Agnantis N, Kittas C, Papavassiliou AG. Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol.* 2002 Oct;198(2):142-56.

Goto S, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T. Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Radic Res* 1999;31:549-58.

Greenon JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, et al. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 2003;27:563-70.

Grem JL, Yee LK, Venzon DJ, Takimoto CH, Allegra CJ. Inter and intra-individual variation in DPD activity in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997. 40:117-25

Grem JL, Danenberg KD, Behan K, Parr A, Young L, Danenberg PV, Nguyen D, Drake J, Monks A, Allegra CJ. Thymidine kinase, thymidylate synthase, and dihydropyrimidine dehydrogenase profiles of cell lines of the NCI's anticancer drug screen. *Clin.Cancer.Res.* 2001. 7:999-1009.

Guan M, Peng HX, Yu B et al. p73 Overexpression and angiogenesis in human colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 215-220.

Gulati S, Baker P, Li YN, Fowler B, Kruger W, Brody LC, Banerjee R. Defects in human methionine synthase in cblG patients. *Hum Mol Genet.* 1996 Dec;5 (12):1859-65.

Haenszel W, Correa P. Cancer of the large intestine: epidemiologic findings. *Dis colon Rectum* 1973;16:371-13

Harwood FG, Kasibhatla S, Petak I, Vernes R, Green DR, Houghton JA (2000) Regulation of FasL by NF-kappaB and AP-1 in Fas-dependent thymineless death of human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 275:10023-10029

Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000;119: 921-8.

Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1998 Jun 9;95(12):6870-5.

Hermanek P, Wiebelt H, Staimner D y col. Prognostic factors of rectum carcinoma-experience of the German multicentre study SGCRC. German Study Group Colo-Rectal carcinoma. *Tumori* 1995, 81: 60-64.

Hinz M., Loser P., Mathas S., Krappmann D., Dorken B., Scheidereit C., Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *Blood* 97 2001; 2798-2807.

Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.*, 1975; 187-226.

Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K: Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995, 20: 191-97

Houlston RS, Tomlinson IP. Polymorphisms and colorectal tumor risk. *Gastroenterology*. 2001 Aug; 121 (2): 282-301.

Howard EW, Cavallo H, Havey LM, Nelson TG. Colon and rectal cancer in the young adult. *Ann Surg* 1975;41:260-265.

Huang, CL, Yokomise H, Kobayasi S, Fukusima M, Hitomi S and Wada H. Intratumoral expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in non-small cell lung cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy. *Int. J. Oncol.*, 2000, 17: 47-54.

Iacopetta B, Grieu F, Joseph D and Elsaleh H. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *British Journal of Cancer* (2001). 85 (6), 827-830

Iacopetta B, Elsaleh H, Zeps N. Microsatellite instability in colon cancer. *N Engl J Med*. 2003. 30;349(18):1774-6.

Iacopetta B. Methyl-Group metabolism and the response of colorectal cancer to 5-Fluorouracil. *Critical Reviews in Oncogenesis* 2006. 12(1-2): 115-116.

Ide T, Kitajima Y, Ohtaka K, Mitsuno M, Nakafusa Y and Miyakazi K. Expression of the hMLH1 gene is a possible predictor for the clinical response to 5-fluorouracil after a surgical resection in colorectal cancer. *Oncology reports* 2008; 19:1571-76.

Ifergan I, Assaraf YG. Molecular mechanisms of adaptation to folate deficiency. *Vitam Horm* 2008;79:99-143.

Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, Kitajima M, Takechi T, Okabe H, Fukushima M. Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity and Messenger RNA level May Be Related to the Antitumor Effect of 5-Fluorouracil on Human Tumor Xenografts in Nude Mice. *Clin Cancer Res*. 1999 Apr;5(4):883-9.

Iwamoto M, Banerjee D, Menon L, Jurkiewicz A, Rao P, Kemeny N, Fong Y, Jhanwar S, Gorlick R and Bertino J. Overexpression of E2F-1 in lung and liver metastases of human colon cancer is associated with gene amplification. *Cancer Biology & Therapy* April 2004. 3:4, 395-99.

Jakob C, Aust DE, Meyer W, Baretton GB, Schwabe W, Häusler P, Becker H, Liersch T. TS, TP, and DPD expression, and histological tumor regression after 5FU-based neo-adjuvant chemotherapy in rectal cancer. *J. pathol*, 2004. 204: 562-8.

Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lideberg J. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. *J Clin Oncol* 2005. 23:1365-69.

Jass JR, Do KA, Simms LA, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998;42:673-9.

Jass JR, Young J, Leggett BA. Evolution of colorectal cancer: change of pace and change of direction. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:17-26.

John Boyer J, McLean EG, Aroori S, Wilson P, McCulla A, Carey PD, Longley DB, and Johnston PG. Characterization of p53 Wild-Type and Null Isogenic Colorectal Cancer Cell Lines Resistant to 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, and Irinotecan *Clin Can Res* 2004; 10, 2158–2167

Johnson JW, Judd S, Dahlin DC. Malignant neoplasms of the colon and rectum in young persons. *Arch Surg* 1959; 79:365–72

Johnson. L. F. Expression of dihydrofolate reductase and thymidylate synthase in mammalian cells. In: C. S. Stein and J. L. Stein (eds.). *Recombinant DNA and Cell Proliferation*, pp. 25–47. New York: Academic Press, 1984.

Johnson LF. Posttranscriptional regulation of thymidylate synthase gene expression. *J Cell Biochem* 1994 ;54:387–392.

Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, Albin N, Diasio RB. Structural organization of human DPD gene. *Cancer Res.*, 1997. 57: 1660–1663

Johnston DG, Cress WD, Jakoi L, Nevins JR. Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91. 12823–7.

Johnston PG, Lenz H-J, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV and Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 1995. 55: 1407–1412

Johnston PG, Mick R, Recant W, Behan KA, Dolan ME, Ratain MJ, Beckmann E, Weichselbaum RR, Allegra C, and Vokes E. Thymidylate Synthase Expression and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Advanced Head and neck Cancer. *J Nat Can Ins* 1997. 89:308–318.

Johnston PG, Benston AB, III, Catalano P, Rao MS, O'Dwyer PJ, and Allegra CJ. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer: lack of correlation with outcome and response to fluorouracil in metastatic disease sites. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21:815–19.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, 1999 Feb; 21 (2): 163–7.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.*, 2002 Jun; 3 (6): 415–28.

Ju J, Pedersen-Lane J, Maley F, Chu E. Regulation of p53 expression by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3769–74.

Kaneda S, Nalbantoglu J, Takeishi K, Shimizu K, Gotoh O, Seno T, Ayusawa D: Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene. *J Biol Chem* 1990, 265: 20277–84.

Kaneda S, Horie N, Takeishi K, Takayanagi A, Seno T, Ayusawa D. Regulatory sequences clustered at the 5' end of the first intron of the human thymidylate synthase gene function in cooperation with the promoter region. *Somat Cell Mol Genet* 1992, 18: 409–15

Kasahara M, Takahashi Y, Nagata T, Asai S, Eguchi T, Ishii Y, Fujii M, Ishikawa K. Thymidylate synthase expression correlates closely with E2F1 expression in colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 Jul;6(7):2707–11.

Kastan MB, Onayekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991. 51:6304–11.

Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B and Fornace AJ JR. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992. 71: 587-97.

Kawakami K, Omura K, Kanehira, and E. Watanabe. G. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism is associated with folate pool in gastrointestinal cancer tissue. *Anticancer Res.*, 2001. 21:285-289.

Kawate H., Sakumi K., Tsuzuki T, Nakatsuru Y. T. Ishikawa, Takahashi S., Takano H., Noda T., Sekiguchi M., Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 5116-5120.

Kazuyuki H, Salonga D, Park JM, Danenberg D, Uetake H; Brabender J, Omura K, Watanabe G and Danenberg PV. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the Thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin. Can Res* 2001, 7: 4096-101.

Kealey C, Brown KS, Woodside JV, et al. A common insertion/deletion polymorphism of the thymidylate synthase (TYMS) gene is a determinant of red blood cell folate and homocysteine concentrations. *Hum Genet* 2005; 116:347-53.

Kim H, Jen J, Vogelstein B, et al. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994;145:148-56.

Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J.* 2002 Aug 1;21(15):4183-95.

Kim YH, Song SY, Kwon YD, Kim DS, Chun HK, Rhee JC. Microsatellite instable double primary cancers of the colorectum and stomach exhibit less favorable outcome. *World J Gastroenterol* 2005;11(26):3998-4002

Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem.* 1999 Feb;10(2):66-88.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70.

Klein CB, Conway K, Wang XW, Bhamra RK, Lin XH, Cohen MD, Annab L, Barrett JC, Costa M. Senescence of nickel-transformed cells by an X chromosome: possible epigenetic control. *Science.* 1991 Feb 15;251(4995):796-9.

Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 157-62.

Kornmann M, Schwabe W et al. Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Expression Levels: Predictors for Survival in Colorectal Cancer Patients Receiving Adjuvant 5-Fluorouracil. *Clinical Cancer Research.* September 15, 2003. Vol 9, 4116-4124.

Krtolica K, Krajnovic M, Usaj-Knezevic S, Babic D, Jovanovic D, Dimitrijevic B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J Gastroenterol* 2007; 13:1187-94

Krugluger W, Brandstaetter A, Kállay E, Schueller J, Krexner E, Kriwanek S, Bonner E, Cross HS. Regulation of genes of the circadian clock in human colon cancer: reduced period-1 and

dihydropyrimidine dehydrogenase transcription correlates in high-grade tumors. *Cancer Res.* 2007 Aug 15;67(16):7917-22.

Kusano M, Toyota M, Suzuki H, et al. Genetic, epigenetic, and clinicopathologic features of gastric carcinomas with the CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer* 2006;106:1467-79.

Lamprecht S, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature Rev*, 2003 Aug; 3: 601-14.

Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, and Henderson BE. The MTHFR C677T Polymorphism and Colorectal Cancer: The Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(5): 1198-203.

Leclerc, D., Campeau, E., Goyette, P., Adjalla, C.E., Christensen, B., Ross, M., Eyedoux, P., Rosenblatt, D.S., Rozen, R. and Gravel, R.A. (1996) Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 1967-1974.21.

Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoué F, Lorient MA, Tregouet DA, Landi B, Berger A, Cugnenc PH, Jian R, Beaune P, Laurent-Puig P. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-Fluorouracil-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2004 Sept 1; 10(17): 5880-8

Lee WH, Isaacs WB, Bova GS, Nelson WG. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997 Jun;6(6):443-50.

Lee Y, Chen Y, Chang LS, Johnson LF. Inhibition of mouse thymidylate synthase promoter activity by the wild-type p53 tumor suppressor protein. *Exp Cell Res.* 1997 Aug 1;234(2):270-6.

Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, Boswell W, Metzger R, Tan M and Danenberg PV. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15:3223-29.

Lenz H-J, Danenberg KD, Leichman CG, Florentine B, Johnston PG, Groshen S, Zhou L, Xiong YP, Danenberg PV and Leichman LP. p53 and thymidylate synthase expression in untreated stage II colon cancer: association with recurrence, survival and site. *Clin Cancer Res* 1998. 4: 1227-1234

Levi, F. Zidani R, Misset JL.. Randomised multicentre trial of oxaliplatin, fluorouracil and folinic acid in metastatic colorectal cancer. *Lancet*, 1997. 350: 681-6

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991 Jun 6;351(6326):453-6.

Liang JT, Huang KC, Lai HS, et al: High frequency microsatellite instability predicts better chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV sporadic colorectal cancer after palliative bowel resection. *Int J Cancer* 101:519-525, 2002

Liu J, Schmitz JC, Lin X, Tai N, Yan W, Farrell M, Bailly M, Chen T, Chu E. Thymidylate synthase as a translational regulator of cellular gene expression. Review. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002. 1587 :174- 182

Liu Z, Lin S. Multilocus LD measure and tagging SNP selection with generalized mutual information. *Genet Epidemiol* 2005; 29: 353-364.

Liu HC, Chen GG, Viantis AC, Leung BC, Tong MC, van Hasselt CA. 5-fluorouracil mediates apoptosis and G1/S arrest in laryngeal squamous cell carcinoma via a p53-independent pathway. *Cancer J*. 2006;12(6):482-93.

Longley MB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology* 2005; 205: 275-292

Lovatt T, Aldersea J, Lear JT, Hoban PR, Ramachandran S, Fryer AA, Smith AG, Strange RC. Polymorphism in the nuclear excision repair gene ERCC2/XPD: association between an exon 6-exon 10 haplotype and susceptibility to cutaneous basal cell carcinoma. *Hum Mutat*. 2005 Apr;25(4):353-9.

Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T., and Housman, D. E. p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 74: 957-967, 1993.

Lowe, S. W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H. E., Fisher, D. E., Housman, D. E., and Jacks, T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science (Washington DC)*, 266: 807-810, 1994.

Lubbert M. AND methylation inhibitors in the treatment of leukemias myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 22: 7572-80.

Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 2000; 71:121-38.

Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Céspedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*. 2007 Feb 15;67(4):1424-9. Erratum in: *Cancer Res*. 2007 Apr 1;67(7):3492

Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*. 2000. 21:551-555.

Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1997 Mar 15;57(6):1098-102.

Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Gravel R, Rozen R. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Sep; 8(9): 825-9.

Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP. Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev*. 1994 Oct 1;8(19):2282-92.

Maeda K, Chung YS, Ogawa Y y col. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996, 73: 884-88.

Malesci A, Laghi L, Bianchi P, et al. Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:3831-9.

Mander AP. Haplotype analysis in population-based association studies. *Stata Journal* 2001; 1:58-75.

Mandola MV, Stoecklacher J, et al. A 6pb polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics*. 2004. May; 1415:319-327

Marcuello E, Altés A, del Río E, César A, Menoyo A, and Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of Thymidylate Synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer*, 2004. 112: 733-737

Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C, Aranas MJ, Lesser M, Schwartz EL, and Augenlicht LH. Gene Expression Profiling-Based Prediction of Response of Colon Carcinoma Cells to 5-Fluorouracil and Camptothecin. *Cancer Research* 2003; 63, 8791-8812.

Marsh S. Thymidylate synthase pharmacogenetics. *Invest New Drugs*. 2005 Dec;23(6):533-7.

Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ et al. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 2000; 19: 66.

Marzio G, Wagener C, Gutierrez MI et al. E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* 2000; 275: 10887-10892.

McLeod HL, Murray GI. Tumours marjers of prognosis in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 1999 79(2): 191-203.

McMillan DC, Hole DJ, Mc Ardle CS. The impact of old age on cancer-specific and non-cancer-related survival following elective potentially curative surgery for Dukes A/B colorectal cancer. *British J of Cancer* 2008. 99:1046-49.

Metzger R, Danenberg K, Leichman CG y col. High basal level gene expression of Thymidylate phosphorilase (Platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-Fluoruracil. *Clin Cancer Res* (1998) 4:2371-76.

Miller FE, Liechty RD. Adenocarcinoma of the colon and rectum in persons under thirty years of age. *Am J Surg* 1967; 113:507-510

Mirjolet J.-F., Didelot C., Barberi-Heyob M., and Merlin J.-L. G1/S but not G0/G1 Cell Fraction Is Related to 5-Fluorouracil Cytotoxicity *Cytometry* 2002. 48:6-13

Morita S, Iida S, Kato K, Takagi Y, Uetake H, Sugihara K. The synergistic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and 5-fluorouracil on drug-resistant tumors *Oncology*. 2006;71(5-6):437-45

Mulcahy HE, Patchett, SE, Daly L, O'Donoghue DP. Prognosis of elderly patients with large bowel cancer. *Br J Surg* 1994. 81:736-38.

Muñoz. *Cancer: Genes y Nuevas Terapias*. Ed. Hélice, 1997

Nishimura R., Nagao K, Miyayama H, Matsuda M, Baba K, Matsuoka Y, Yamashita H, Fukuda M, Higuchi A, Satoh A, Mizumoto T and Hamamoto R. Thymidylate synthase levels as a therapeutic and prognostic predictor in breast cancer. *Anticancer Res.*, 2000, 19: 5621-26.

Nagasaka T, Sharp GB, Notohara K, Kambara T, Sasamoto H, Isozaki H, MacPhee DG, Jass JR, Tanaka N, Matsubara N. Hypermethylation of O6-methylguanine-DNA

methyltransferase promoter may predict nonrecurrence after chemotherapy in colorectal cancer cases. Clin Cancer Res. 2003; 9(14):5306-12

Napieralski R, Ott K, Kremer M, Becker K, Boulesteix A, Lordick F, Siewert J, Ho H, and Gisela Keller. Methylation of Tumor-Related Genes in Neoadjuvant-Treated Gastric Cancer: Relation to Therapy Response and Clinicopathologic and Molecular Features Clin Cancer Res 2007;13(17):5095-103.

Narayanan S, McConnell J, Little J, Sharp L, Piyathilake CJ, Powers H, Basten G, and Duthie SJ. Associations between two common variants C677T and A1298C in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes *in vivo*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004;13(9): 1436-43).

Nguyen H, Tran A, Lipkin S, and Fruehauf P. Pharmacogenomics of Colorectal Cancer Prevention and Treatment. Cancer Investigation 2006; 24:630-639

Nief N, Morvan V, Robert J. Involvement of gene polymorphisms of thymidylate synthase in gene expression, protein activity and anticancer drug cytotoxicity using the NCI-60 panel. Eur J Can 2007. 43:955-962.

Nita ME, Tomimaga O, Tsuruo T and Muto T. Dihydropyrimidine dehydrogenase but not thymidylate synthase expression is associated with resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer. Hepato-Gastroenterology, 1998, 45: 2117-22.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. 1976; 194:23-8.

Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, et al. CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations. J Mol Diagn 2006; 8:582-8.

Ohtani H, Yashiro M, Onoda N, Nishioka N, Kato Y, Yamamoto S, Fukushima S, Hirakawa Y, Chung K. Synchronous multiple primary gastrointestinal cancer exhibits frequent microsatellite instability. Int J Cancer 2000; 86: 678-683

Oleg K. Glebov, Luz M. Rodriguez, Kenneth Nakahara, Jean Jenkins, Janet Cliatt, Casey-Jo Humbyrd, John DeNobile, Peter Soballe, Richard Simon, George Wright, Patrick Lynch, Sherri Patterson, Henry Lynch, Steven Gallinger, Aby Buchbinder, Gary Gordon, Ernest Hawk, and Ilan R. Kirsch. Distinguishing Right from Left Colon by the Pattern of Gene Expression Cancer Epidemiol Biomarkers and Prev 2003. Vol. 12, 755-762

Otake Y, Tanakara F, Yanagihara K, Hitomi S, Okabe H, Fukushima M, Wada H. Expression of Thymidylate Synthase in Human Non-small Cell Lung Cancer. Jpn J Cancer Res 1999; 90:1248-53.

Papamichael D. The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: Current Status. Stem Cells 2000, 18 (3): 166-75.

Paradiso A, Simone G, Petroni S, Leone B, Vallejo C, Lacava J, Romero A, Machiavelli M, De Lena M, Allegra CJ and Johnston PG. Thymidylate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. Br J Cancer 2000. 82: 560-567

Park JJ, Kim HC, Yoon YS, Yu CS, Jang SJ, Kim JC. Clinicopathological Characteristics of Colorectal Cancer with Family History: an Evaluation of Family History as a predictive factor for microsatellite instability. J Korean Med Sci 2007; 22 (Suppl): S91-7 ISSN 1011-8934

Patterson AV, Talbot DC, Stratford IJ, Harris AL. Thymidine phosphorylase moderates thymidine-dependent rescue after exposure to the thymidylate synthase inhibitor ZD1694 (Tomudex) in vitro. *Cancer Res.* 1998 Jul 1;58(13):2737-40.

Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Cespedes M, Herman JG, Esteller M. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res.* 2002 Aug 1;62(15):4519-24.

Paz MF, Wei S, Cigudosa JC, Rodriguez-Perales S, Peinado MA, Huang TH, Esteller M. Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cancer cells deficient in DNA methyltransferases. *Hum Mol Genet.* 2003 Sep 1;12(17):2209-19. Epub 2003 Jul 15.

Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, García-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ, Balaña C, Sanchez-Cespedes M, García-Villanueva M, Arribas L, Esteller M. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1;10(15):4933-8

Pegg, A. E. Mammalian O6-alkylguanine-DNA methyltransferase regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res* 1990. 50: 6119–6129.

Pennisi, E. How a growth control path takes a wrong turn to cancer. *Science (Wash. DC)*, 1998. 81: 1438–1439.

Peters GJ, van der Wilt CL, van Groeningen CJ, Smid K, Meijer S and Pinedo HM Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients: implications for treatment with fluorouracil. *J Clin Oncol* 1994. 12: 2035–2042

Peters GJ, van Triest B, Backus HH, Kuiper CM, van der Wilt CL, Pinedo HM: Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *Eur J Cancer* 2000, 36: 916–24.

Philp AJ, Phillips WA, Rockman SP, Vincan E, Baindur-Hudson S, Burns W, Valentine R, Thomas RJ. Microsatellite instability in gastrointestinal tract tumours. *Int J Surg Investig.* 2000;2(4):267-74.

Pinedo, H.M, Peters, G.J. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J.Clin.Oncol.*, 1988. 6: 1653-1664.

Pitluk H, Paticha SM. Carcinoma of the colon and rectum in patients less than 40 years of age. *Surg Gynecol Obstet* 1983; 157:335-337. / Walton WW Jr, Hagihara PF, Griffen WO Jr. Colorectal adenocarcinoma in patients less than 40 years old. *Dis colon Rectum* 1976; 19:529-534

Plasencia C, Taron M, Abad A, Barnadas A. Capítulo 15: Genes de quimiorresistencia. En: *Manual de Oncología clínica y Molecular*. Ed Arán, 2000.

Poirier LA. Methyl group deficiency in hepatocarcinogenesis. *Drug Metab Rev.* 1994; 26(1-2): 185-99.

Poon PP, Storms RK. Thymidylate synthase is localized to the nuclear periphery in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1994; 269:8341–8347.

Pressacco J, Mitrovski B, Erlichman C, Hedley DW. Effects of thymidylate synthase inhibition on thymidine kinase activity and nucleoside transporter expression. *Cancer Res.* 1995 Apr 1;55(7):1505-8.

Qu GZ, Grundy Pe, Mayaran A, Ehrlich M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 109:34-9.

Rabbani F, Richon VM, Orlow I, Lu ML, Drobnjak M, Dudas M, Charytonowicz E, Dalbagni G, Cordon-Cardo C. Prognostic significance of transcription factor E2F-1 in bladder cancer: genotypic and phenotypic characterization. *J Natl Cancer Inst.* 1999 May 19;91(10):874-81.

Rashid A, Issa JP. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology.* 2004; 127(5):1578-88

Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin. Oncol* 1998 Apr 25(suppl.5):4-12.

Recalde M, Holyoke ED, Elias EG. Carcinoma of the colon, rectum and anal canal in young patients. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 139:909-913.

Recio P, Bussey HJR. The pathology and prognosis of carcinoma of the rectum in the young. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1965; 58:789-90.

Reik W, Lewis A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet.* 2005 May;6(5):403-10.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349:247-257, 2003

Rideout WM 3rd, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science.* 1990 Sep 14;249(4974):1288-90.

Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol.* 1996 Dec 24;52(12):1855-65.

Rustum YM, Cao S. New drugs in therapy of colorectal cancer preclinical studies. *Sem Oncol* 1999 26 (6): 612-20.

Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. The expression of Thymidine Phosphorilase correlates with angiogenesis and the efficacy of chemotherapy using fluorouracil derivatives in advanced gastric carcinoma. *Br. J. Cancer,* 1999. 81: 484-9.

Salonga, D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV. Colorectal tumors responding to 5FU have low gene expression levels of DPD, TS, and TP. *Clin. Cancer Res.,* 2000. 6: 1322-27.

Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirodda N, Elfring GL, Miller LL. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study group. *N. Engl. J. Med.,* 2000. 343: 905-914.

Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J. et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res* 2005; 65:6063-69.

Samsonoff WA, Reston J, McKee M, O'Connor B, Galivan J, Maley G, Maley F. Intracellular location of thymidylate synthase and its state of phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272:13281–85.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004; 73:39-85

Sato K, Kitajima Y, Miyoshi A, Koga Y and Miyazaki K. Deficient expression of the DPD gene is caused by epigenetic modification in biliary tract cancer cells, and induces high sensitivity to 5-FU treatment . *Int J Oncol* 2006. 29: 429-435.

Shah MA, Schwartz GK: Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7:2168-81

Shankar A, Taylor I. Treatment of colorectal cancer in patients aged over 75. *Eur J Surg Oncol* 1998. 24:391-95.

Sharma R, Hoskins JM, Rivory LP, Zucknick M, London R, Liddle C, and Clarke S. Thymidylate Synthase and Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Toxicity to Capecitabine in Advanced Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14(3): 817-25.

Sharp L. Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Clin Epidemiol* 2004;159:423-43.

Shen H, Xu Y, Zheng Y, Qian Y, Wang X, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. *Int J Cancer*. 2001 Sept 20;95(5):332-6.

Shen M, Hung RJ, Brennan P, Malaveille C, Donato F, Placidi D, Carta A, Hautefeuille A, Boffetta P, Porru S. Polymorphisms of the DNA Repair Genes XRCC1, XRCC3, XPD, Interaction with Environmental Exposures, and Bladder Cancer Risk in a Case-Control Study in Northern Italy. *Cancer Epidemiology & Prevention*. November 2003. Vol 12. 1234-1240.

Sherr, C. J. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.*, 12: 2434–2442, 1998.

Shiga H, Heath EI, Rasmussen AA, Trock B, Johnston PG, Forastiere AA, Langmacher M, Baylor A, Lee M, Cullen KJ. Prognostic Value of p53, Glutathione-S-Transferase π and Thymidylate Synthase for Neoadjuvant Cisplatin-based Chemotherapy in Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research*. December 1999. Vol 5, 4097-4104.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* (2003) 22, 7265-7279.

Sirotnak, F. M., and Tolner, B. (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19, 91–122

Smyrk TC, Watson P, Kaul K, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* 2001;91:2417–22.

Spears, C. P., Antranik, A. H., Moran, R. G., Heidelberger, C., and Corbett, T. H. In vitro kinetics of thymidylate synthase inhibition in 5-fluorouracil sensitive and resistant murine colon adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 42:450-456. 1982.

Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic AND hypomethylation, a characteristic of most cancers is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylene tetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Aug;9 (8): 849-53.

Strickler JG, Zheng J, Shu Q, Burgart LJ, Alberts SR, Shibata D. p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fail. *Cancer Res* 1994; 54: 4750-4755

Takebayashi Y, Akiyami S, Akiba S y col. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996, 88: 1110-17.

Takechi T, Okabe H, Fujioka A, Murakami Y and Fukushima M. Relationship between Protein Levels and Gene Expression of Dihydropyrimidin Dehydrogenase in Human Tumor Cells during Growth in Culture and in Nude Mice. *Cancer Res.* 1998; 89: 1144-53.

Takeishi K, Kaneda S, Ayusawa D, Shimizu K, Gotoh O, Seno T: Human thymidylate synthase gene: Isolation of phage clones which cover a functionally active gene and structural analysis of the region upstream from the translation initiation codon. *J Biochem* 1989, 106: 575-83.

Taron M, Plasencia C, Abad A. Preclinical synergy of oxaliplatin (oxa), Topoisomerase I-inhibitor (Topotecan) and 5-Fluorouracil in sensitive and 5-Fluorouracil resistant HT-29 cell line. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 1999. Abst. 691.

Taylor WR, Stark GR: Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001; 20:1803-15.

Terrazino S, Agostini M, Pucciarelli S, et al. A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene predicts poor tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiation. *Pharmacogenet Genomics* 2006. 16:817-24.

Toi M, Hoshina S, Taniguchi T y col. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast cancer. *Int J Cancer* 1995, 64: 79-82.

Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999 Oct;9(5):349-57

T Trinh BN, Ong CN, Coetzee GA, Yu MC, Laird PW. Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels. *Hum Genet* 2002; 111:299-302.

Tycko b. Epigenetic gene silencing in cancer. *J Clin Invest,* 2000; 105: 401-7.

Ueki T, Walter KM, Skinner H, Jaffee E, Hruban RH, Goggins M. Aberrant CpG island methylation in cancer cell lines arises in the primary cancers from which they were derived. *Oncogene.* 2002 Mar 27;21(13C):2114-7.

Uetake H, Ichikawa W, Takechi T, Fukushima M, Nihei Z, and Kenichi Sugihara. Relationship between Intratumoral Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity and Gene Expression in Human Colorectal Cancer. *Clin Can Res.* 1999, 5 :, 2836-39.

Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, Fosdick L, Beresford SA, Yasui Y, Potter JD. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Aug;8(8):659-68.

Van der Wilt CL, Backus HH, Smid K, Comijn L, Veerman G, Wouters D, Voorn DA, Priest DG, Bunni MA, Mitchell F, Jackman AL, Jansen G, Peters GJ. Modulation of both endogenous folates and thymidine enhance the therapeutic efficacy of thymidylate synthase inhibitors. *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3675-81

Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Beke E, Bobba B, Boffi P et al. Identification of three novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene associated with altered pre RNAm splicing or protein function. *Biol. Chem* 2005; 286:319-329.

- Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(8): 2898-90
- Van Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers JL, van Diest PJ, Schoenmakers PS, Voorn DA, Smid K, Hoekman K, Hoitsma HF and Peters GJ (2000) Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 6: 1063-1072
- Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, García-Foncillas J, Azinovic I, Martínez E, Illarramendi JJ, Arias F, Martínez Monge R, Salgado E, Angeletti S, Brugarolas A. Polymorphisms of the Repeated Sequences in the Enhancer Region of the Thymidylate Synthase Gene Promoter May Predict Downstaging After Preoperative Chemoradiation in Rectal J Clin Oncol. 2001 Mar 15;19(6):1779-86.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32.
- Wadler S, Horowitz R, Zhang H and Schwartz E. Effects of perturbations of pools of deoxyribonucleoside triphosphates on expression of ribonucleotide reductase, a G1/S Transition State Enzyme, in p53-mutated cells. *Biochemical Pharmacology* 1998. 55:1353-60.
- Wang C.Y., Mayo M.W., Baldwin Jr. A.S., TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB, *Science* 274 (1996) 784-787.
- Ward R, Meagher A, Tomlinson I, et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 2001;48:821-9.
- Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Hawkins NJ. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2003; 21:3729-36.
- Washtien, W. L. Increased levels of thymidylate synthase in cells exposed to 5-fluorouracil. *Mol. Pharmacol.*, 25: 171-177, 1984. 18.
- Watanabe T, Wu T-T, Catalano PJ, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001;344:1196-206. Weinberg RA. The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol Ther* 1996, 2 (2): 105-10.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998. 62:1044-51.
- Weisenberg DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:387-93
- Williams C Jr. Carcinoma of the colon in childhood. *Ann Surg* 1954; 139:816-822.
- Wilson PM, Fazzone W, LaBonte MJ, Lenz HJ, Ladner RD. Regulation of human dUTPase gene expression and p53-mediated transcriptional repression in response to oxaliplatin-induced DNA damage *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37(1):78-95.
- Wolmark N, Wieand HX, Rockette HE y col. The prognostic significance of tumour location and bowel obstruction in Dukes' Band C colorectal cancer. *Ann Surg* 1983, 198: 743-50.

Wong NA, Brett L, Stewart M, Leitch A, Longley DB, Dunlop MG, Johnston PG, Lessells AM, Jodrell DI. Nuclear thymidylate synthase expression, p53 expression and 5FU response in colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 2001 Dec 14;85(12):1937-43.

Wood PA, Du-Quiton J, You S and Hrushesky W Circadian clock coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index. *Mol Cancer Ther* 2006;5(8).

Woynarowski JM, Chapman WG, Napier C, Herzig MC, Juniewicz P. Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Mol Pharmacol*. 1998 Nov;54(5):770-7.

Yamashita K, Mikami Y, Ikeda M, Yamamura M, Kubozoe T, Urakami A, Yoshida K, Kimoto M and Tsunoda T. Gender differences in the dihydropyrimidine dehydrogenase expression of colorectal cancers. *Cancer letters* 2002; 188:231-236.

Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, Perucho M. Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell* 2003;4:121-31

Yang B, Stambrook PJ, Markowitz SD. Wild-type p53 demonstrates functional dominance in a human colon carcinoma cell line in which it induces reversible growth arrest. *Clin Cancer Res*. 1996 Oct;2(10):1639-47.

Yeh KH, Shun CT, Chen CL, Lin JT, Lee WJ, Lee PH, Chen YC and Cheng AL. High expression of thymidylate synthase is associated with the drug resistance of gastric carcinoma to high dose 5-fluorouracil-based systemic chemotherapy. *Cancer (Phila)*, 1998, 82: 1626-31.

Yu X, Robinson YF, Gribble E, Hong SW, Sidhu JS, Faustman EM. Gene expression profiling analysis reveals arsenic-induced cell cycle arrest and apoptosis in p53-proficient and p53-deficient cells through differential gene pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008; 233: 389-403.

VII. ANEXOS

ENCUESTA PACIENTES TRATADOS CON 5-FU

Nombre:

Apellidos:

Sexo: Varón ☐ / Mujer ☐

Fecha de nacimiento: ____/____/____

Otras enfermedades de tipo no oncológico (diabetes, infarto de miocardio, hipertensión, trombosis, colesterol, etc.)

Hábitos personales:

1. **Tabaquismo**; ¿fuma? No ☐ Si ☐

Cantidad: _____

¿Exfumador? No ☐ Si ☐

Cantidad: _____

¿fumador pasivo? No ☐ Si ☐

2. **Alcohol**: ¿bebe habitualmente? No ☐ Sí ☐ Cantidad: _____

3. ¿Practica algún **deporte**? No ☐ Sí ☐ Frecuencia: _____

4. **Dieta**: Vegetariana ☐ Rica en carne ☐ Rica en pescado ☐ Variada ☐

¿Consume frutos secos? ☐ Frecuencia: _____

¿Consume fruta y verdura habitualmente? ☐

¿Consume comida rápida/precocinada? ☐ Frecuencia: _____

¿Consume embutidos habitualmente? ☐ Frecuencia: _____

¿Consume bollería industrial? ☐ Frecuencia: _____

5. **Drogas**: ¿Consume o ha consumido drogas o estupefacientes?

No ☐ Si ☐ Cantidad: _____

Firma:

Fecha:

ANEXO II: Relación de alimentos ricos en folato

Alimento	Porción	microgramos (ug) de folato
Espárragos *	1/2 taza (6 unidades)	131
Hojas de nabo	1 taza	106
Zumo de naranja	8 oz	75
Frijoles (e.j. alubia, carilla o caupí, frijol pinto o judía pinta, frijol blanco, frijol rojo, gandules, habas, entre otros) *	1/4 taza	30-89 (rango)
Remolacha	1/2 taza	68
Espinaca	1 taza	58
Aguacate	1/2 mediano	57
Guisantes	1/2 taza	47
Coles de bruselas *	1/2 taza	47
Lechuga romana	1 taza	41
Maní o cacahuates	1 onza (aprox. 30)	41
Naranja	1 mediana	40
Pan blanco enriquecido	1 rebanada (1 oz)	35
Brécol o brócoli	1/2 taza	31
Tomates	1 taza	31
Lechuga repollada	1 taza	30
Fresas	1 taza	26
Zumo de pomelo	8 oz	25
Mantequilla de cacahuete o maní	2 cucharadas	25
Banana o plátano	1 mediano	22
Maíz *	1/2 taza	19
Pomelo	1/2 mediana	15
Pan integral	1 rebanada (1 oz)	14

Información de la publicación *Bowes & Church's Food Values of Portions Commonly Used*, 18th ed., escrito por J. Pennington, J. Pungen Douglass, 2005.

* cocido, no enlatado